

Untersuchungen zum C₁-Stoffwechsel
des Braunfäulepilzes **Poria contigua**
und Charakterisierung der Alkoholoxidase

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stephanie Bringer
aus Köln

1980

Untersuchungen zum C₁-Stoffwechsel
des Braunfäulepilzes **Poria contigua**
und Charakterisierung der Alkoholoxidase

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stephanie Bringer
aus Köln

1980

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Sahm

Korreferent: Prof. Dr. C. Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 1980

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biotechnologie I der Kernforschungsanlage Jülich GmbH ausgeführt. Herrn Prof. Dr. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die Diskussionsbereitschaft und die Anregungen für diese Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Floßdorf (GBF, Braunschweig) für die Messungen in der analytischen Ultrazentrifuge, Herrn Prof. Dr. Buse (RWTH Aachen) für die Aminosäureanalyse, Herrn Dr. Wolff (KFA Jülich) für die Atomabsorptions- und Atomemissionsspektral-Messungen, Herrn Bochem (KFA Jülich) für die Aufnahme der elektronenmikroskopischen Bilder, Herrn Prof. Dr. Hemmerich (Universität Konstanz) für seinen Rat bei der Aufnahme und Interpretation von Enzymabsorptionsspektren und allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie, die mir behilflich waren.

Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-äthyl-benzthiazolin-sulfonat-6)
Bis	N,N'-methylenbisacrylamid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DHP	Dehydropolymerisat des Coniferylalkohols
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
NAD(P)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (phosphat)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N' - tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	2
II.	Material und Methoden	12
1.	Organismen	12
2.	Chemikalien	13
3.	Nährmedien und Kulturbedingungen	14
4.	Herstellung von zellfreien Extrakten	16
5.	Bestimmungsmethoden enzymatischer Aktivitäten	18
6.	Gelelektrophoretische Trennungen	21
7.	Saccharose-Gradienten Zentrifugation	26
8.	Elektronenmikroskopische Methoden	26
9.	Immunologische Methoden	28
10.	Weitere Methoden	28
III.	Ergebnisse	34
1.	Vorkommen von C ₁ -oxidierenden Enzymen in einigen holzzersetzenden Pilzen	34
2.	Isolierung der Alkoholoxidase	40
3.	Charakterisierung der Alkoholoxidase aus <i>Poria contigua</i>	49
4.	Elektronenmikroskopische Lokalisierung der Katalase und Alkoholoxidase in <i>Poria contigua</i>	60
5.	Immunologische Untersuchungen	65
6.	Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Vanillinsäure	70
IV.	Diskussion	81
V.	Zusammenfassung	89
VI.	Literaturverzeichnis	91

I. Einleitung=====

Wie in den letzten Jahren gezeigt wurde, können mehrere Bakterien und Hefen auf Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen. Da diese Organismen auch biotechnologisch Interesse gefunden haben, wurden eine Reihe von stoffwechselphysiologischen Untersuchungen ihres C_1 -Metabolismus durchgeführt (Übersichtsartikel: QUAYLE, 1972; REUSS et al., 1974; SAHM, 1977; TANI et al., 1978; COLBY et al., 1979).

Die Methanol-verwertenden Hefen, die den Gattungen *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* und *Torulopsis* angehören, oxidieren das Methanol mit Hilfe einer Alkoholoxidase zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid. Dieses Enzym wurde von TANI et al. (1972 a, 1972 b) und KATO et al. (1976) aus *Kloeckera* sp., von SAHM und WAGNER (1973 a) aus *Candida boidinii*, von FUJII und TONOMURA (1972) aus *Candida N-16* und von VAN DIJKEN (1976) und KATO et al. (1976) aus *Hansenula polymorpha* isoliert und charakterisiert. In allen Fällen wurden hohe Molekulargewichte (600 000 - 670 000) gefunden und FAD als prosthetische Gruppe der Alkoholoxidasen identifiziert. Ein ähnliches Enzym beschrieben JANSSEN et al. (1965) aus *Polyporus* sp., einem Basidiomyceten.

Der bei der Methanol-Oxidation entstehende Formaldehyd wird im dissimilatorischen Stoffwechsel der Hefen über Formiat zu Kohlendioxid oxidiert (Abb.1). Die Formaldehyd Dehydrogenase wurde aus verschiedenen Hefen isoliert (SCHÜTTE et al., 1976; KATO et al., 1972; VAN DIJKEN, 1976). Das Enzym ist von reduziertem Glutathion abhängig und überträgt den Wasserstoff auf NAD. Das sich aus Formaldehyd und Glutathion spontan bildende Hemimercaptal ist das eigentliche Substrat der Formaldehyd Dehydrogenase, so daß das Reaktionsprodukt S-Formylglutathion ist, welches entweder durch das Folgeenzym Formiat Dehydrogenase, oder durch eine Hydrolase (SCHÜTTE et al., 1976) zu Formiat und Glutathion hydrolysiert wird. Wie die Formaldehyd Dehydrogenasen, sind auch die Formiat Dehydrogenasen aus Hefen (SCHÜTTE et al.,

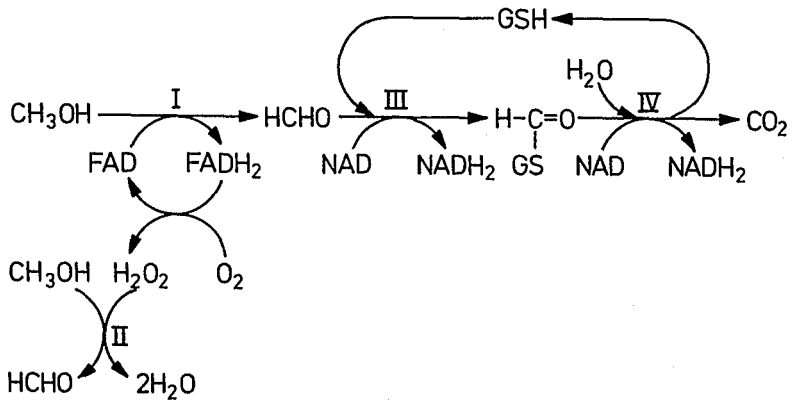


Abb. 1: Methanol-Oxidation durch Methanol-verwertende Hefen. I:Alkoholoxidase, II: Katalase, III: Formaldehyd Dehydrogenase, IV: Formiat Dehydrogenase. (SAHM, 1977)

1976; KATO et al., 1974; VAN DIJKEN, 1976) NAD-abhängige Enzyme mit untereinander sehr ähnlichen molekularen und kinetischen Eigenschaften.

Das zweite Reaktionsprodukt der Alkoholoxidase-Reaktion, Wasserstoffperoxid, ist ein Zellgift und kann von der Katalase entweder zu Sauerstoff und H_2O disproportioniert oder peroxidativ mit Methanol zu Formaldehyd und H_2O umgesetzt werden. Bei den Methanol-verwertenden Hefen überwiegt die peroxidative Reaktion (FUJII und TONOMURA, 1972; ROGGENKAMP et al., 1974; VAN DIJKEN, 1976). Die Katalase wird, wie auch die anderen Enzyme der Methanol-Oxidation in methylotrophen Hefen, durch Methanol induziert (ROGGENKAMP et al., 1974).

Wasserstoffperoxid-freisetzende Oxidasen und Katalase sind sowohl in tierischen als auch pflanzlichen Zellen häufig in speziellen Zellkompartimenten, den Microbodies, lokalisiert worden (TOLBERT, 1971; DE DUVE und BAUHUIN, 1966). Auch die Alkoholoxidase und Katalase der Methanol-verwertenden Hefen konnten

in Microbodies nachgewiesen werden, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen in Verbindung mit cytochemischen Färbetechniken (VAN DIJKEN et al. 1975; VEENHUIS et al., 1976; FUKUI et al., 1975) und die Isolierung und enzymatische Analyse dieser Organelle (ROGGENKAMP et al., 1975; FUKUI et al., 1975) ergaben. In diesen Microbodies wurden ferner kristalloide Einschlüsse beobachtet, die wahrscheinlich von der Alkoholoxidase gebildet werden (SAHM et al., 1975).

Die Assimilation von C_1 -Verbindungen erfolgt in methylotrophen Bakterien entweder auf der Oxidationsstufe des Kohlendioxids (Calvin Zyklus) oder des Formaldehyds. Dieser kann mit einem C_5 -Zucker kondensieren (Ribulose Monophosphat oder Quayle Zyklus) oder mit Glycin reagieren und als Serin in den anabolen Stoffwechsel eingeschleust werden (SAHM, 1977; COLBY et al., 1979). Kürzlich wurde für drei Methanol-verwertende Hefen ein vierter Assimilationsweg beschrieben, bei dem der C_5 -Zucker Xylulose-5-Phosphat das Akzeptormolekül für den Formaldehyd ist (VAN DIJKEN et al., 1978; KATO et al., 1979).

Bisher nur für drei Vertreter mycelbildender Pilze, den Ascomyceten *Gliocladium deliquescens*, *Paecilomyces varioti* (SAKAGUCHI et al., 1975) und *Trichoderma lignorum* (TYE und WILLETTTS, 1973) wurde eine Verwertung von Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle beschrieben. In *Paecilomyces varioti* wird die Methanol-Oxidation durch eine NAD-abhängige Dehydrogenase katalysiert, während für *Gliocladium deliquescens* der enzymatische Mechanismus dieser Reaktion noch ungeklärt ist. Diese beiden Organismen assimilieren C_1 -Verbindungen wahrscheinlich über den Serin-Weg.

KERWIN und RUELIUS (1969) wiesen in Zellhomogenaten von sechs verschiedenen Basidiomyceten z.T. sehr hohe Alkoholoxidase-Aktivitäten nach; die Basidiomyceten stellen den größten Teil der saprophytisch oder parasitisch auf Holz wachsenden Mikroorganismen, die neben der Cellulose und den Hemicellulosen auch

das Lignin angreifen. Lignin ist aus teilweise methoxylierten Phenylpropan-Monomeren aufgebaut, die untereinander durch verschiedenartige Bindungen vernetzt sind (Abb. 2)

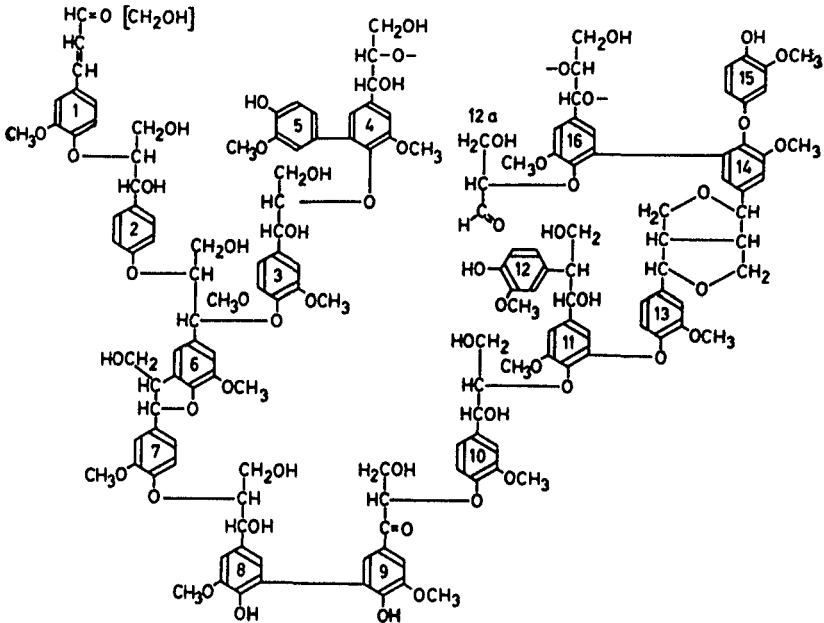


Abb. 2: Schematischer Ausschnitt des Ligninmoleküls. (ANDER und ERIKSSON, 1978)

Die physiologische Unterteilung holzerstörender Basidiomyceten in Erreger der Braunfäule, die die cellulose- und hemicelluloseartigen Bestandteile des Holzes zersetzen und in Erreger der Weißfäule, die das Lignin angreifen (BAVENDAMM, 1928; DAVIDSON et al., 1938), muß nach neueren Untersuchungen (SUNDMAN und NÄSE, 1971) dahingehend korrigiert werden, daß viele dieser Pilze Lignin und Cellulose gleichzeitig verwerten und insbesondere Braunfäulepilze zur Demethylierung des Lignins befähigt sind (Übersichtsartikel: KIRK, 1971; HIGUCHI, 1971; KIRK, 1975 a;

KIRK et al., 1977; Ander und ERIKSSON, 1978; CRAWFORD und CRAWFORD, 1980). Diese Feststellung wurde an natürlichen, aus Holz extrahierten Ligninen durch chemische Analysen (KIRK und Adler, 1970; KIRK und Chang, 1974, 1975; KIRK, 1975 b) und auch an synthetischem, radioaktiv markiertem Lignin (DHP), welches durch Dehydropolymerisation von Coniferylalkohol mit Peroxidase gewonnen wird, durch die Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ aus markierten Methoxylgruppen (HAIDER und TROJANOWSKI, 1975, 1978; KIRK et al., 1975) gemacht. Versuche zur Aufklärung enzymatischer Mechanismen des Ligninangriffs erwiesen sich dagegen als äußerst schwierig, wenn als Substrat natürliches, oder DHP-Lignin verwendet wurde (ERIKSSON, 1979). Daher wurden für die meisten enzymatischen Untersuchungen monomere oder dimere Lignin-Modellsubstanzen verwendet. Im folgenden sind die bisher bekannten Mechanismen der C_1 -Abspaltung aus solchen Ligninmonomeren aufgeführt.

a) Intrazelluläre Mono-Oxygenasen, die methoxylierte Benzoesäuren demethylieren und hydroxylieren, sind hauptsächlich für Bakterien, aber auch für einige Pilze beschrieben worden. Diese Enzyme benötigen verschiedene Cofaktoren, wie NAD(P)H und Glutathion und spalten die Methoxylgruppen als Formaldehyd ab. Mono-Oxygenasen wurden in vielen Pseudomonaden (CARTWRIGHT und BUSWELL, 1967, 1969; RIBBONS, 1970; BUSWELL und MAHMOOD, 1972; BERNHARDT et al., 1975; s. auch ANDER und ERIKSSON, 1978) und in den Pilzen *Xerocomus badius* und *Chaetomium piluliferum* (PASECZYŃSKI und TROJANOWSKI, 1977), *Polystictus sanguineus* (MINAMI et al., 1965) und *Poria subacida* (FUKUZUMI et al., 1969) nachgewiesen. Die Demethylierung und Hydroxylierung verleiht dem aromatischen Ring eine größere Hydrophilie und ermöglicht die Ringspaltung durch Dioxygenasen (Abb. 3), die bei Bakterien sowohl intradiol (ortho), als auch extradiol (meta) erfolgen kann (STANIER und ORNSTON, 1973).

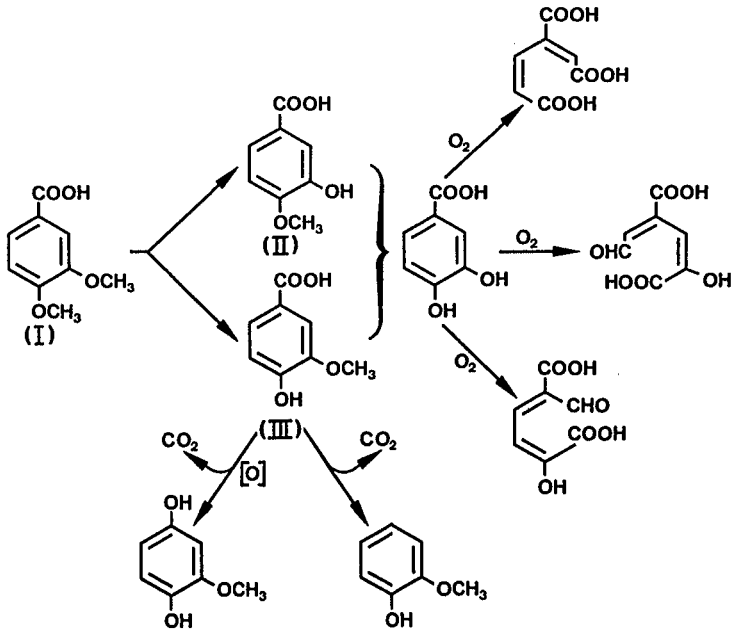


Abb. 3: Verschiedene Wege der mikrobiellen Umsetzung von Veratricsäure (I), Isovanillinsäure (II) und Vanillinsäure (III); (CRAWFORD und CRAWFORD, 1980)

b) In Zellextrakten von *Pseudomonas putida* (SPARNINGS und DAGLEY, 1975) und *Arthrobacter* sp. (LEE et al., 1978) wurde eine andere Demethylierungssequenz nachgewiesen, bei der eine der Methoxylgruppen erst nach einer meta-Ringspaltung als Methanol freigesetzt wird (Abb. 4; Abb. 5). Anders als bei ortho-Ringspaltungen, die über β -Ketoacid zu den Spaltungsprodukten Succinat und Acetyl-CoA führen (STANIER und ORNSTON, 1973), wird bei der in Abbildung 5 dargestellten Reaktionsfolge der aromatische Ring über Methoxymaleinsäure zu Methanol, Pyruvat und Oxalessäure umgesetzt.

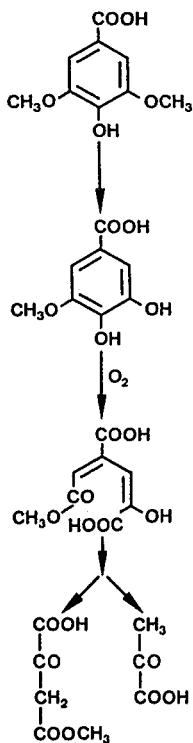


Abb. 4: 3-O-Methylgallat-Weg des Abbaus von Syringasäure durch *Pseudomonas putida*. Eine Methoxylgruppe erscheint nach meta-Spaltung des Ringes als Ester der Oxalelessigsäure. (SPARNINGS und DAGLEY, 1975)

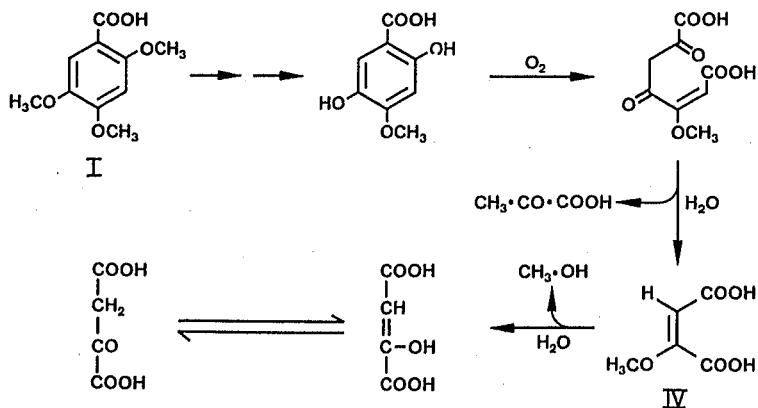


Abb. 5: Abbau von 2,4,5-Trimethoxybenzoesäure (I) durch *Arthrobacter* sp.; eine Methoxylgruppe wird nach der Ringspaltung aus Methoxymaleinsäure (IV) als Methanol freigesetzt. (LEE et al., 1978)

c) Den extrazellulären Phenoloxidasen Laccase (O_2 : Diphenol Oxidoreduktase) und Peroxidase (Donator: H_2O_2 Oxidoreduktase) wurden viele verschiedene Funktionen beim Ligninabbau zugeschrieben, so auch Demethylierungsaktivitäten. Mit Hilfe selektiver Enzyminhibitoren fanden TROJANOWSKI et al. (1966), daß die Peroxidase und Laccase des Basidiomyceten *Pholiota mutabilis* die Demethylierung von Lignin und Vanillinsäure katalysieren. In den Untersuchungen von ISHIHARA und MIYAZAKI (1974) und ISHIHARA und ISHIHARA (1975, 1976) wurden kleine Mengen Methanol als Produkt der Demethylierung von Lignin und Lignin-Modells-substanzen mit gereinigter Laccase des Basidiomyceten *Polyporus versicolor* gemessen. Abbildung 6 zeigt die Reaktion dieser Laccase mit Syringasäure (3,5-Dimethoxy-4-Hydroxybenzoesäure). Die komplexe Reaktionsstöchiometrie, bei der ein Achtel der Methoxylgruppen als Methanol freigesetzt werden, wird von den Autoren durch einen freien Radikalmechanismus erklärt.

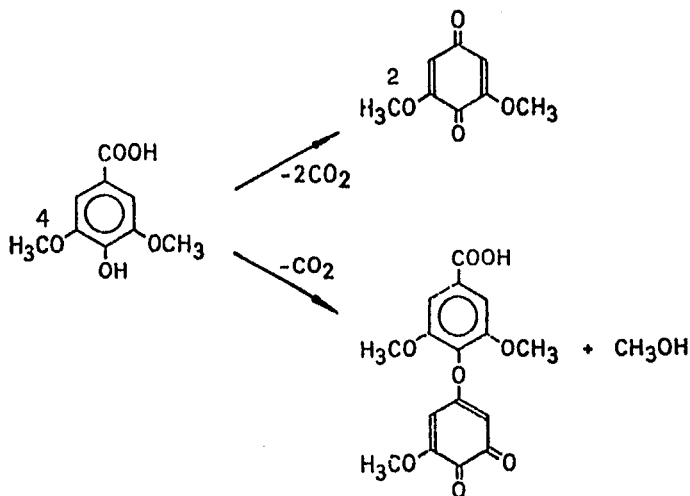


Abb. 6: Laccase-katalysierte Umsetzung von Syringasäure. (ISHIHARA und ISHIHARA, 1976)

d) Während bei den vorgenannten Beispielen der primäre Angriff auf methoxylierte Benzoesäuren, die, zumindest teilweise Demethylierung und Hydroxylierung des aromatischen Ringes ist, kann auch eine Decarboxylierung die Oxidation dieser Aromaten initiieren (Abb.3). Eine nicht-oxidative Decarboxylierung von Vanillinsäure (3-Methoxy-4-Hydroxybenzoesäure) zu Guaiacol (2-Methoxyphenol) ist von einigen Stämmen von *Bacillus megaterium* und von einem *Streptomyces* sp. bekannt (CRAWFORD und PERKINS-OLSON, 1978). Erst kürzlich publizierte Untersuchungen weisen darauf hin, daß eine oxidative Decarboxylierungsreaktion bei dem Abbau von Benzoesäure-Derivaten durch Pilze von Bedeutung ist, obwohl solche oxidative Decarboxylierungen schon seit längerem für Pilze beschrieben wurden (HENDERSON, 1957; FUKUZUMI et al., 1964; KIRK und LORENZ, 1973). Die oxidative Decarboxylierung der Vanillinsäure zu Methoxyhydrochinon wurde in Zell-extrakten und mit angereicherten Enzympräparaten des Weißfäulepilzes *Sporotrichum pulverulentum* untersucht (BUSWELL et al., 1979; YAJIMA et al., 1979). BUSWELL und ERIKSSON (1979) beschrieben ebenfalls die Ringspaltung von Hydroxychinol; obwohl der Mechanismus der Demethylierung noch nicht geklärt ist, vermutet ERIKSSON (1979), daß in vivo die dritte Hydroxylgruppe durch Hydroxylierung und nicht durch Demethylierung in den Ring eingeführt wird (Abb. 7). Das die Vanillinsäure decarboxylierende Enzym ist für para-Hydroxybenzoesäuren spezifisch. Abweichend von bisher bekannten, zumeist bakteriellen, ringspaltenden Dioxygenasen, sind ortho-Dihydroxybenzoesäuren für *Polyporus dichrous* (KIRK und LORENZ, 1973) und *Sporotrichum pulverulentum* (BUSWELL und ERIKSSON, 1979) keine Substrate ringspaltender Enzyme; eine dritte Hydroxylgruppe scheint für die Ringspaltung durch diese Organismen notwendig zu sein.

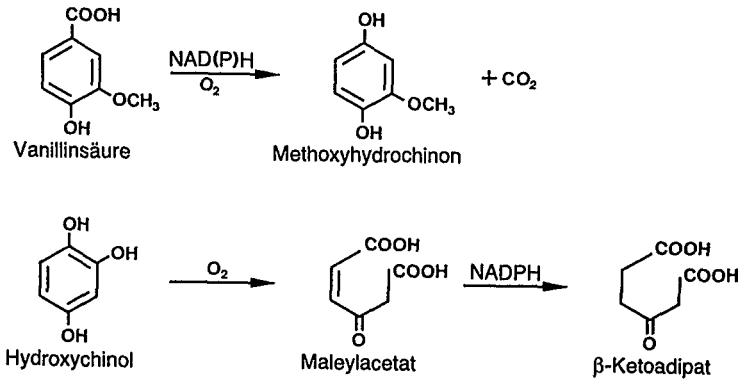


Abb. 7: Vanillinsäure-Oxidation durch *Sporotrichum pulverulentum*. (BUSWELL et al., 1979; BUSWELL und ERIKSSON, 1979)

Aus einer Reihe von Untersuchungen geht hervor, daß holzzer-
setzende Basidiomyceten bei dem Angriff auf das Lignin redu-
zierte C₁-Verbindungen abspalten. Die Fragestellung der vor-
liegenden Arbeit war, ob und in welcher Weise solche Verbindungen
durch diese höheren Pilze verwertet werden können.

II. Material und Methoden

1. Organismen

Die in dieser Arbeit untersuchten Organismen gehören zu den holz-zersetzenden höheren Pilzen. Die beiden methanolverwertenden Hefestämme wurden für vergleichende enzymatische Untersuchungen verwendet (Tab. 1).

Tab. 1: Verwendete Organismen

	Fäulnistyp	Herkunft
Basidiomycetes		
<i>Coniophora puteana</i> (Nr. 15)	Braunfäule	Dr. K. Haider FAL Braunschweig
<i>Lenzites abietina</i> (Nr. 68)	Braunfäule	"
<i>Lenzites sepiaria</i> (Nr. 885)	Braunfäule	"
<i>Lenzites trabea</i> (Nr. 109)	Braunfäule	"
<i>Merulius lacrymans</i> (Nr. 1)	Braunfäule	"
<i>Merulius silvester</i> (Nr. 213)	Braunfäule	"
<i>Polystictus versicolor</i>	Weißfäule	"
<i>Poria contigua</i> (Nr. 361)	Braunfäule	"
<i>Poria monticola</i> (Nr. 280)	Braunfäule	"
<i>Poria vaporaria</i> (Nr. 125)	Braunfäule	"
<i>Bjeskandera adusta</i> (23585b)	nicht bekannt	Prof. F. Oberwink- ler, Universität Tübingen
<i>Schizophyllum commune</i>	Weißfäule	"
<i>Agrocybe aegerita</i> (Ac. Ital.)	nicht bekannt	Dr. F. Zadrazil FAL Braunschweig
<i>Pleurotus ostreatus</i> (vierea II)	Weißfäule	"
<i>Polyporus adustus</i>	Weißfäule	ATCC 28 315
<i>Polyporus adustus</i> (Cellulase-less Mutante)		ATCC 28 312
<i>Polyporus obtusus</i>	Weißfäule	ATCC 26 733
Ascomycetes		
<i>Chaetomium piluliferum</i>	Moderfäule	Dr. K. Haider FAL Braunschweig
Hefen		
<i>Candida boidinii</i>		ATCC 32195
<i>Hansenula polymorpha</i>		CBS 4732

2. Chemikalien

Außer den hier aufgeführten Substanzen wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Agarose	Serva Heidelberg
2-Amino-1,2,4-triazol	Serva Heidelberg
2,2'-Azino-di-(3-äthyl- -benzthiazolin-sulfonat-6)	Boehringer Mannheim
Bacto-Agar	Difco Laboratories Detroit, USA
Bathophenanthrolin	Serva Heidelberg
D-Aminosäure Oxidase	Boehringer Mannheim
3,3'-Diaminobenzidin	Serva Heidelberg
3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure)	Roth Karlsruhe
Eichproteine für die Gel- filtration	Pharmacia Uppsala, Schweden
Eichproteine fpr die SDS-Poly- acrylamidgel Elektrophorese	Boehringer Mannheim
Freund's adjuvant	Calbiochem Gießen
Hefeextrakt	Difco Laboratories Detroit, USA
Isovanillinsäure	Serva Heidelberg
Methoxyhydrochinon	Aldrich-Europe Nettetal
4-Nitroblautetrazoliumchlorid	Serva Heidelberg
Pektin	Serva Heidelberg
Peroxidase	Boehringer Mannheim
Phenazin-methosulfat	Serva Heidelberg
Sephacryl S-300	Pharmacia Uppsala, Schweden
Sephadex G-50	Pharmacia Uppsala, Schweden
Ultrafilter UM 10, UM 05	Amicon Witten
Vanillinsäure	Serva Heidelberg
Antiserum gegen die Alkoholoxidase aus <i>Candida boidinii</i> wurde freundlicherweise von Dr. L. Eggeling (IBT der KFA Jülich) zur Verfügung gestellt.	

3. Nährmedien und Kulturbedingungen

a) Medien für Basidiomyceten

Komplettmedium:

Hefeextrakt	4 g	
Malzextrakt	10 g	der pH wurde auf
Glukose	4 g	6 eingestellt
Aqua deion.	1000 ml	

Semisynthetisches Medium:

KH_2PO_4	1 g	
K_2HPO_4	1 g	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g	
NaNO_3	1 g	
KCL	0.5 g	
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g	
Hefeextrakt	0.5 g	
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	5 mg	
CaCl_2	5 mg	der pH wurde auf
$\text{MnSO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$	4 mg	6 eingestellt
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mg	
Ammoniumheptamolybdat	0.5 mg	
H_3BO_3	0.5 mg	
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0.5 mg	
Biotin	0.1 mg	
Thiamin	1.0 mg	
Riboflavin	1.0 mg	
Nicotinsäure	1.0 mg	
Glukose	10.0 g	
Aqua deion.	1000 ml	

Derivate der Benzoesäure wurden 0.05 % (g/v) zugegeben.

b) Medien für Hefen

Candida boidinii und *Hansenula polymorpha* wurden nach der
Vorschrift von SAHM und WAGNER (1972) kultiviert.

Komplettmedium: wie 3.a) jedoch wurde der pH auf 7 eingestellt.

Minimalmedium:

NH_4NO_3	2	g	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	g	
KH_2PO_4	1	g	
K_2HPO_4	2	g	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	1	g	
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.2	g	
KCL	0.2	g	
H_3BO_3	0.5	mg	
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0.04	mg	der pH wurde auf
KJ	0.1	mg	5 eingestellt
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0.2	mg	
$\text{MnSO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$	0.4	mg	
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.4	mg	
Ammoniumheptamolybdat	0.2	mg	
Biotin	0.05	mg	
Thiamin	0.1	mg	
Aqua deion.	1000	ml	
Methanol abs.	10	ml	(nach dem Autoklavieren)

Zur Verfestigung der Medien wurde 2 % (g/v) Bacto-Agar zugesetzt. Die Medien wurden 20 Minuten im gespannten Dampf bei 120 °C autoklaviert.

c) Kulturbedingungen für Basidiomyceten

Sämtliche Kulturen wurden submers auf einer rotierenden Schüttelmaschine gezüchtet. Erlenmeyer Kolben der folgenden Größen wurden verwendet: 100 ml-Kolben mit 20 ml Medium, 500 ml-Kolben (zwei seitliche Einstiche) mit 100 ml Medium und 2 l-Kolben (zwei seitliche Einstiche) mit 500 ml Medium. Die Umdrehungszahl der Schüttelmaschine betrug für 100 ml- und 500 ml-Kolben 100 U/min und für 2 l-Kolben 90 U/min bei einer Inkubationstemperatur von 27 °C. Für das Beimpfen der Flüssigmedien wurde

entweder eine Mycelsuspension oder ausgestanzte Scheiben (\varnothing 1 cm) von der Peripherie bewachsener Agarplatten verwendet. Zur Herstellung von Mycelsuspensionen wurden die Organismen auf verfestigtem Kompletmedium in 500 ml-Erlenmeyer Kolben kultiviert; nach zwei Wochen Inkubation wurde das Luftmycel mit 20 ml Saline (0.9 % NaCl) abgeschwemmt, durch Schütteln mit Glasperlen (\varnothing 0.5 mm) zerkleinert und durch Glaswolle filtriert. Ein Milliliter dieser Suspension diente als Inoculum für 100 ml Medium. Die Inkubationszeiten betrugen, je nach Stamm, 9 bis 20 Tage.

d) Kulturbedingungen für Hefen

Submerskulturen der Hefen wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (100 U/min) in 500 ml-Erlenmeyer Kolben mit zwei seitlichen Einstichten, die je 100 ml Medium enthielten, angezogen. Die Inkubationstemperatur betrug 30 °C. Als Impfmateriel für das Minimalmedium diente 1 ml einer zweimal mit 0.9 % NaCl gewaschenen Kultur, die 20 Stunden in Kompletmedium gewachsen war. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden.

4. Herstellung von zellfreien Extrakten

a) Ernte und Zellaufschluß von Basidiomyceten

Die Kultur wurde mit Hilfe eines Büchner-Trichters abfiltriert und mehrere Male mit 0.05 M Kaliumphosphat Puffer pH 7.5 gewaschen, bis das Filtrat annähernd farblos war. Zellmaterial, welches nicht sofort weiterverarbeitet wurde, wurde in Portionen von 15 - 20 g Naßgewicht in Polyallomer-Röhrchen (\varnothing 2.5 cm) bei -20 °C aufbewahrt.

Zellaufschluß mit der x-Press:

Die bei -20 °C gelagerten Mycelien wurden im gefrorenen Zustand in eine, bei -20 °C vorgekühlte x-Press (AB Biox, Nacka, Schwe-

den) überführt, eine Stunde bei -20°C belassen, und dann mit einer Hydraulik-Presse 3 - 6-mal durch eine Öffnung von 0.8 mm Durchmesser gedrückt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde in einem doppelten Volumen 0.05 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5, unter pH-Kontrolle aufgetaut.

Zellaufschluß mit der French Presse:

Die aus der Kulturlösung abfiltrierten und gewaschenen Mycelien wurden in einem dreifachen Volumen 0.05 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5, aufgenommen und im Eisbad 1 min mit einem Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen/Br.) suspendiert. Das Zellmaterial wurde dann 3-mal bei 1300 Atm. durch eine French Presse (American Instrument Co., Silver Springs, Md.) gedrückt.

Zellaufschluß mit Glasperlen:

Für größere Mengen aufzuschließenden Zellmaterials wurde eine Zelmühle (Dyno-Mill, Bachofen AG, Basel) verwendet. Die Mycelien, wie oben beschrieben mit einem Ultra-Turrax vorsuspendiert, wurden 10 min bei 7°C gemahlen. Durch Dekantieren und einmaliges Nachspülen wurde der Rohextrakt von den Glasperlen (\varnothing 0.5 - 0.75 mm) abgetrennt.

Die Zelltrümmer der Rohextrakte wurden bei 30 000 oder 48 000 g und 4°C , 30 min abzentrifugiert. Die gewonnenen Überstände dienten als zellfreie Extrakte.

b) Ernte und Zellaufschluß von Hefen

Die durch Zentrifugation geernteten Zellen (5 min, 4000 g) wurden zweimal mit 0.05 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5, gewaschen und in demselben Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mit der x-Presse wie 4.a).

5. Bestimmungsmethoden enzymatischer Aktivitäten

Die Aktivität der folgenden Enzyme wurde bei 30 °C bestimmt. Zur Messung von Oxidase-Aktivitäten wurden luftgesättigte Lösungen verwendet. Eine Enzymeinheit (U) entsprach einem μmol umgesetzten Substrats, bzw. gebildeten Produkts pro Minute unter den angegebenen Bedingungen. Spezifische Aktivitäten sind in U/mg Protein ausgedrückt.

a) Alkoholoxidase , Messung der Wasserstoffperoxid-Freisetzung

Wie von SAHM und WAGNER (1973) beschrieben, wurde die Wasserstoffperoxid-Bildung kolorimetrisch verfolgt. Einzelheiten der Indikatorreaktion sind von WAHLEFELD (1971) untersucht worden.

Reaktionsansatz (1 ml):

50 μmol Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5
100 μmol Methanol
2 μmol ABTS
3 U Peroxidase
Enzym

Die Oxidation des Chromophors ABTS durch H_2O_2 wurde bei 420 nm registriert ($\epsilon = 43.2 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$). Dieser Nachweis der Alkoholoxidase-Aktivität war auch qualitativ zur Visualisierung des Enzyms in Polyacrylamidgelen anwendbar.

b) Alkoholoxidase, Messung der Sauerstoffabnahme

Der Sauerstoffverbrauch der Reaktion wurde polarographisch mit einer Clark-Elektrode (Yellow Springs Instrument Co., Inc, USA) verfolgt.

Reaktionsansatz (3 ml):

150 μmol Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5
300 μmol Methanol
Enzym

Für die Berechnung wurde ein Sauerstoffgehalt der luftgesättigten Inkubationslösung bei 30 °C von 240 µM vorausgesetzt. (DAWES, 1972). Diese Aktivitätsmessung, der Alkohol Oxidase war um den Faktor 10 unempfindlicher als die kolorimetrische H₂O₂-Bestimmung, war jedoch wenig störanfällig gegen zusätzlich im Reaktionsansatz vorhandene Substanzen (endogene Substrate in zellfreien Extrakten, Aktivitätsmessungen in Gegenwart von Redoxsubstanzen).

c) Katalase

Auf Grund der Absorption von Wasserstoffperoxid im ultravioletten Licht läßt sich die Katalasereaktion durch die Extinktionsabnahme bei 240 nm ($\epsilon = 0.040 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) messen (AEBI, 1974).

Reaktionsansatz (1 ml):

50 µmol Kaliumphosphat Puffer, pH 7.0

10 µmol H₂O₂

Enzymlösung ($\Delta E < 0.04/\text{min}$)

Im Gegensatz zu unter Substratsättigung ablaufenden Reaktionen ist die Katalase-Reaktion eine Reaktion erster Ordnung, bei der eine direkte Proportionalität zwischen Substratkonzentration und Spaltungsgeschwindigkeit besteht. Um den Meßfehler klein zu halten, wurden täglich frische H₂O₂-Verdünnungen verwendet und der Reaktionsverlauf während der ersten 30 - 60 sec ausgewertet.

d) Formaldehyd Dehydrogenase

Die Aktivitätsbestimmung wurde in einem Ansatz nach SCHÜTTE et al., (1976) durchgeführt.

Reaktionsansatz (3 ml):

100 μmol Natriumphosphat Puffer, pH 8.0
6 μmol reduziertes Glutathion
3 μmol NAD
3.3 μmol Formaldehyd
begrenzende Mengen Enzymlösung

Die Reduktion des NAD wurde bei 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) verfolgt. Es wurden jeweils drei Ansätze, die mit Glutathion, NAD und Formaldehyd gegen entsprechende Blindwerte gestartet wurden, gemessen.

e) Formiat Dehydrogenase

Die Enzymaktivität wurde ebenfalls nach SCHÜTTE et al., (1976) bestimmt.

Reaktionsansatz (3 ml):

150 μmol Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5
5 μmol NAD
500 μmol Natriumformiat
begrenzende Mengen Enzymlösung

Auch hier wurde die Reduktion des NAD bei 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) verfolgt.

f) Vanillinsäure Hydroxylase

Das Enzym katalysiert eine NADH-abhängige, oxidative Decarboxylierung der Vanillinsäure (BUSWELL et al., 1979; YAJIMA et al., 1979). Der Sauerstoffverbrauch der Reaktion wurde in einer O_2 -Meßzelle bestimmt (s. 5.b).

Reaktionsansatz (3 ml):

150 μmol Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5
3 μmol NADH
3 μmol Vanillinsäure
10 - 15 mg Protein

Die untersuchten Enzympräparate wiesen relativ hohe NADH-Oxidase-Aktivitäten auf; diese wurden jeweils von dem Gesamtsauerstoffverbrauch (in Gegenwart von NADH und Vanillinsäure) subtrahiert.

Qualitativer Nachweis der Vanillinsäure Hydroxylase in Polyacrylamidgelen

Tetrazoliumsalze werden, zusammen mit dem Elektronenüberträger Phenazinmethosulfat, zum optischen Nachweis von NADH verwendet (SKYRING et al., 1970). Da bei der Vanillinsäure Hydroxylase-Reaktion NADH verbraucht wird, wurde eine Negativfärbung durchgeführt, die zu Aufhellungszonen im Bereich aktiver Proteinbanden führte. Nach der Elektrophorese wurden die Gele jeweils 30 Minuten in den folgenden Lösungen inkubiert:

- A. 0.1 M Vanillinsäure, 1.3 mM NADH, gelöst in 0.05 M Tris-HCl Puffer, pH 7.5
- B. 0.3 mM p-Nitro-blautetrazoliumchlorid, 0.065 mM Phenazinmethosulfat, 0.2 mM MnCl_2 , gelöst in 0.05 M Tris-HCl Puffer, pH 7.5.

Nach der Bandenentwicklung wurden die Gele in 7 %-iger Essigsäure lichtgeschützt aufbewahrt.

6. Gelelektrophoretische Trennungen

Analytische und präparative Polyacrylamidgel Elektrophoresen wurden mit 7 %-igen Flachgelen in einem Plattengel-Elektrophoresegerät (Hölzel, München) bei 4 °C durchgeführt.

a) Analytische Polyacrylamidgel Elektrophoresen

Die Dicke der Flachgele betrug 1.5 mm. Das Trennsystem war eine Modifikation nach MAURER (1971):

Lösung Nr. 1: Trenngelpuffer

3 M Tris-HCl, 0.23 % (V/V) TEMED, pH 8.9

Lösung Nr. 2: 30.0 g Acrylamid

0.8 g Bis

mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt

Lösung Nr. 3: 0.14 g Ammoniumperoxodisulfat / 100 ml H₂O

Lösung Nr. 4: Sammelgelpuffer

0.49 M Tris-HCl, 0.46 % (V/V) TEMED, pH 6.7

Lösung Nr. 5: 12.0 g Acrylamid

0.8 g Bis

mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt

Lösung Nr. 6: 4.0 mg Riboflavin / 100 ml H₂O

Mischungsverhältnis für das Trenngel:

Nr. 1	1 Teil
Nr. 2	1.9 Teile
Nr. 3	4 Teile
H ₂ O	1.1 Teile

Mischungsverhältnis für das Sammelgel:

Nr. 4	1 Teil
Nr. 5	2 Teile
Nr. 6	1 Teil
H ₂ O	4 Teile

Elektrodenpuffer:

0.6 g Tris, 28.8 g Glycin / 1 l, pH 8.3

Nach der Elektrophorese (7 mA, 200 V) wurden die Gele über Nacht gefärbt (0.05 % Coomassieblau R 250, 25 % Isopropyl-Alkohol, 10 % Essigsäure) und danach in 10 % Essigsäure entfärbt.

b) Präparative Polyacrylamidgel Elektrophorese

Das Gelsystem entsprach dem unter 6.a beschriebenen und, 5 mm dicke Gele wurden verwendet. Je nach Trennproblem wurden 40 - 90 mg Protein auf ein Gel aufgetragen. Zur Lokalisierung der Proteinbanden nach der Elektrophorese (20 mA, 300 V) diente ein Papierabdruck (Whatman Nr. 1) des Gels: das Papier wurde 5 Minuten auf dem Gel belassen, getrocknet, in Coomassieblau-Lösung (s. 6.a) gefärbt, in 10 %-iger Essigsäure entfärbt und wieder getrocknet. Der Papierabdruck wurde seitenverkehrt im Durchlicht unter das Gel gelegt und die Enzymbande ausgeschnitten. Zur Identifizierung von Enzymbanden in den Gelen erfolgten Aktivitätsanfärbungen, die mit den dazugehörigen Papierabdrücken verglichen wurden. Flavoenzyme, wie die Alkoholoxidase, waren darüberhinaus als schwach gelbe Banden im Gel sichtbar.

Die Gelbanden wurden bei -20°C eingefroren, in der x-Pressse zerkleinert und in H_2O suspendiert. Die Suspensionen wurden über Nacht bei 4°C gerührt und dann in einem Ti 50-Rotor 1 Stunde zentrifugiert. Dieser Extraktionsvorgang wurde 1-mal wiederholt, die vereinigten Überstände gegen 0.05 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5 dialysiert und über einem Amicon Ultrafilter eingeeengt.

c) Polyacrylamidgel Elektrophoresen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS)

SDS-Gelelektrophoresen wurden mit Gelsystemen nach WEBER und OSBORN (1969) und nach NEVILLE (1971) durchgeführt.

SDS-Elektrophorese nach WEBER und OSBORN:

Lösung Nr. 1: Gelpuffer

7.8 g NaH_2PO_4

25.6 g Na_2HPO_4

2 g SDS

in 1000 ml entlüftetem H_2O

Lösung Nr. 2: 22.2 g Acrylamid

0.6 g Bis

mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt

Lösung Nr. 3: 150 mg Ammoniumperoxdisulfat / 10 ml H₂O

Mischungsverhältnis für ein 10 %-iges Gel:

Nr. 1 15 ml

Nr. 2 13.5 ml

Nr. 3 1.5 ml

TEMED 0.045 ml

Elektrodenpuffer:

Gelpuffer, 1:2 mit H₂O verdünnt

Probenvorbehandlung:

2 Stunden Inkubation bei 50 °C in 10 mM Natrium-
phosphat Puffer, pH 7.0, mit 1 % SDS und 1 % (V/V)
2-Mercaptoäthanol

SDS-Elektrophorese nach NEVILLE:

Lösung A: oberer Elektrodenpuffer

0.04 M Borsäure

0.041 M Tris

0.1 % SDS

pH 8.64

Lösung B: unterer Elektrodenpuffer

0.424 M Tris-HCl

pH 9.18

Lösung Nr. 1: 55 g Acrylamid

mit B auf 100 ml aufgefüllt

Lösung Nr. 2: 1 g Bis
mit B auf 100 ml aufgefüllt

Lösung Nr. 3: 0.75 ml TEMED / 100 ml B

Lösung Nr. 4: 0.5 g Ammoniumperoxodisulfat / 100 ml B

Lösung Nr. 5: Sammelgel Puffer
0.216 M Tris- H_2SO_4
0.33 % (V/V) TEMED
pH 6.1

Lösung Nr. 6: 12.0 g Acrylamid
0.8 g Bis
mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt

Lösung Nr. 7: 4 mg Riboflavin / 100 ml H_2O

Mischungsverhältnis für das Trenngel (11 %-ig):

Nr. 1	2 Teile
Nr. 2	1 Teil
Nr. 3	1 Teil
Nr. 4	1 Teil
B	5 Teile

Mischungsverhältnis für das Sammelgel:

Nr. 5	1 Teil
Nr. 6	2 Teile
Nr. 7	1 Teil
H_2O	4 Teile

Probenvorbereitung:

1 Minute bei 100 °C in 0.216 M Tris- H_2SO_4 Puffer,
pH 6.1, mit 2 % SDS und 10 % (V/V) 2-Mercapto-
äthanol.

SDS-Elektrophoresen zur Bestimmung des Molekulargewichts von Enzymuntereinheiten wurden in Gegenwart geeigneter Eichproteine durchgeführt. Die Gele wurden nach der Methode von FAIRBANKS et al., (1971) angefärbt.

7. Saccharose-Gradienten Zentrifugation

Die Alkoholoxidase aus *Poria contigua* konnte durch Saccharose-Gradienten Zentrifugation nach GOLDTHWAITE und BOGORAD (1971) aus vorgereinigten Präparaten isoliert werden. Probenvolumina von 0.5 ml (4.0 - 4.5 mg Protein) wurden auf lineare, 11 ml Saccharose Gradienten geschichtet, die mit einem Dichtegradienten-former (Beckman Instruments GmbH, München) in SW-41 Zellulose-Nitrat Zentrifugenröhrchen hergestellt wurden. Die Saccharosekonzentration reichte von 0.2 bis 0.7 M (7 - 24 % g/V) und war bei pH 7.5 mit 0.02 M Tris-H₂SO₄ gepuffert. Die Gradienten wurden 17 Stunden in einem SW-41 Rotor bei 28 000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die Fraktionierung der Gradienten nach der Zentrifugation erfolgte mit einem Elutionsgerät (Beckman Instruments) von oben, indem 1 M Saccharose (34 g/V) von unten nachgepumpt wurde. Während der Elution wurde die Absorption bei 280 nm in einem Durchflußphotometer registriert und die entsprechenden Fraktionen gesammelt.

8. Elektronenmikroskopische Methoden

a) Cytochemische Färbetechniken

Katalase und Alkoholoxidase von *Poria contigua* wurden mittels der 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Reaktion elektronenmikroskopisch in Microbodies lokalisiert. Diese Methode wurde von NOVIKOFF und GOLDFISCHER (1969) beschrieben; sie basiert auf der enzymatischen Oxidation von DAB durch Wasserstoffperoxid zu einem Phenazin-Polymer, welches am Ort der H₂O₂-Entstehung mit Osmiumtetroxid ein unlösliches, amorphes, elektronendichtes Chelat bildet.

Die in Kulturmedium suspendierten Mycelien wurden durch tropfenweise Zugabe von Glutaraldehyd (2% V/V) fixiert und dann mit 0.1 M Tris-HCl Puffer, pH 8.5 gewaschen. Die Inkubationslösung für die Katalase-Anfärbung (VAN DIJKEN et al., 1975) bestand aus: 10 mg DAB und 0.06% H_2O_2 in 5 ml 0.1 M Bicarbonat Puffer, pH 10.5. Die Proben wurden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. In den Kontrollen fehlte entweder DAB oder H_2O_2 . Einem zusätzlichen Kontrollansatz wurde der Katalase Inhibitor 3-Amino-1,2,4-triazol (HEIM et al., 1956; MARGOLIASH et al., 1960) zugesetzt.

Die Inkubationslösung zur Anfärbung der Alkoholoxidase (VEENHUIS et al., 1976) bestand aus: 10 mg DAB und 50 mM Methanol in 0.1 M Tris-HCl Puffer, pH 8.5. Die Proben wurden 2 Stunden bei 37 °C unter Sauerstoff-Begasung inkubiert. Methanol-freie Inkubationslösungen dienten als Kontrollen.

Die Mycelien wurden in einer 2% (g/V) Mischung von OsO_4 und $K_2Cr_2O_7$ 16 Stunden bei 4 °C nachfixiert und in SPURR's (1969) Epoxyharz eingebettet. Dünnschnitte wurden mit einem LKB Ultratome III angefertigt und auf Formvar-beschichtete Kupfernetze überführt. Die mit Bleicitrat angefärbten Dünnschnitte (VENABLE und COGGESHALL, 1965) wurden in einem Phillips EM 400 Elektronenmikroskop ausgewertet.

b) Elektronenmikroskopische Analyse der Alkoholoxidase

Aufgrund des hohen Molekulargewichts der Alkoholoxidase war es möglich, das Enzym elektronenoptisch abzubilden. Jeweils ein Tropfen Enzymlösung wurde auf Objektträgern (Formvar-beschichtete Kupfernetze) aufgezogen und mit 2% Uranylacetat negativ angefärbt. Die Präparate wurden in einem Siemens Elmiskop I Elektronenmikroskop ausgewertet und bei einer Primärvergrößerung von 80 000:1 photographiert.

9. Immunologische Methoden

a) Präparation des Antiserums

Gegen die Alkoholoxidase aus *Poria contigua* gerichtete Antikörper wurden durch Injektion des gereinigten Enzyms in Kaninchen entwickelt. Dazu wurden 2.3 mg Enzym, gelöst in 1 ml 0.05 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5, zusammen mit 1 ml Freund's complete adjuvant und 0.2 ml 9 % NaCl-Lösung, subkutan einem Kaninchen injiziert. Zwei weitere Injektionen (je 1.9 mg Protein) folgten in wöchentlichen Abständen. Das Blut wurde von der Ohrvene des Tieres entnommen. Nach Gerinnung des Blutes wurde das Serum abpipettiert und bei -20°C aufbewahrt.

b) Immunodiffusion und Immunelektrophorese

Doppel-Immunodiffusionen (OUCHTERLONY, 1958) wurden in 2 %-igen Agarose-gelen durchgeführt, die 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, mit 0.005 % Merthiolat enthielten.

Für die Immunelektrophorese wurden Agarose-Elektrophoreseplatten (Corning ACI, Californien USA) verwendet. Der Elektrodenpuffer war 0.05 M Barbitol-HCl, pH 8.6. Bei der Elektrophorese (30 min) wurden 15 V/cm angelegt.

10. Weitere Methoden

a) Proteinbestimmung

Für Proben mit Proteingehalten > 0.5 mg/ml wurde die Biuret Reaktion (GORNALL et al., 1949) durchgeführt. Das Biuret Reagenz bestand aus:

9 g K-Na-Tratrat
3 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
5 g KJ

gelöst in 1000 ml 0.2 N NaOH.

0.2 ml Probe wurden mit H_2O auf 1 ml aufgefüllt und mit 0.2 ml 3 M Trichloressigsäure ausgefällt. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Präzipitat in 0.2 ml H_2O aufgenommen, mit 1 ml Biuret Reagenz versetzt und nach 30 min bei 546 nm gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

Die Proteinbestimmung nach LOWRY et al., (1951) wurde für dialysierte Präparate mit geringen Proteinkonzentrationen angewendet.

b) Proteinaussalzung mit Ammoniumsulfat

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Fällungen bei $0^\circ C$ durchgeführt und zur Gleichgewichtseinstellung mindestens 2 Stunden gerührt. Ammoniumsulfatkonzentrationen wurden nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Gramm } (NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77 \cdot V \cdot (S-s)}{3.54 - S}$$

V = Volumen der Lösung in ml

S bzw. s = gewünschte bzw. vorliegende Ammoniumsulfatsättigung bei $0^\circ C$ in Bruchteilen von 1.

c) Präparation und Bestimmung von Formaldehyd

Als Substrat für die Alkoholoxidase diente Formaldehyd, der aus Paraformaldehyd gewonnen wurde: 0.5 g Paraformaldehyd / 5 ml H_2O wurden in einer zugeschmolzenden Ampulle 15 Stunden bei $100^\circ C$ gehalten. Da der Depolymerisationsgrad des Produktes nicht leicht zu bestimmen ist und Repolymerisation eintreten kann, wurde käufliche Formaldehydlösung (Merck, mit 10 % Methanol stabilisiert) als Standard verwendet. Die Bestimmung von Formaldehyd durch die Chromotropsäure-Reaktion wurde von FRISELL und MACKENZIE (1958) beschrieben; das Reagenz besteht aus:

0.5 g Chromotropsäure

gelöst in 50 ml H_2O

und 200 ml 12.5 M H_2SO_4 .

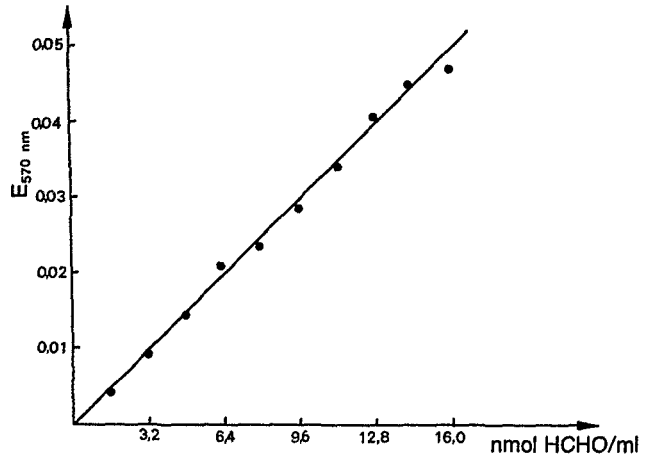


Abb. 8: Standardkurve zur Formaldehyd-Bestimmung mit der Chromotropsäure-Reaktion

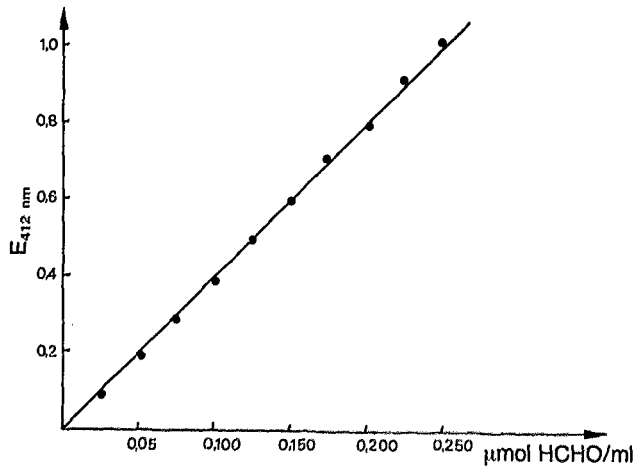


Abb. 9: Standardkurve zur Formaldehyd-Bestimmung nach NASH (1953)

Die Empfindlichkeit der Reaktion konnte erhöht werden, indem nur 1 ml Chromotropsäure Reagenz zu 1 ml Probe gegeben wurde. Nach 30 min Inkubation bei 100 °C wurde die Farbentwicklung bei 570 nm gemessen (Abb. 7).

Das Reagenz für die Formaldehyd-Bestimmung nach NASH (1953) bestand aus:

2 mol Ammoniumacetat
0.05 mol Essigsäure
0.02 mol Acetylaceton

mit H₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

1 ml Reagenz und 1 ml Probe wurden gemischt, 10 min bei 60°C inkubiert und bei 412 nm gemessen (Abb. 8).

d) Metall-Spurenanalysen

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Nicht-Häm Eisen mit Batho-phenanthrolin (DOEG und ZIEGLER, 1962) wurde das von SCHERER (1978) modifizierte Verfahren angewendet. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist sehr hoch: Eisenkonzentrationen bis zu 10 µM können quantifiziert werden. Weitere Spurenanalysen von Fe und Zn erfolgten mittels Atomabsorptions- und Atomemissions-spektral-Messungen.

e) FAD-Bestimmung

FAD wurde aus hitzedenaturierten Enzymextrakten (2 min, 100 °C) durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten identifiziert. Zwei Laufmittel kamen zur Anwendung (PAZUR und KLEPPE, 1964):

- I. n-Butanol, Methanol, 0.05 % Na₂HPO₄, 4:1:2 (V/V)
- II. n-Butanol, Aceton, Essigsäure, H₂O, 5:2:1:3 (V/V).

Die Quantifizierung des FAD erfolgte, ebenfalls in hitzedenaturierten Enzymextrakten, nach Zentrifugation (20 min, TI-50 Rotor, 35 000 Upm) anhand der Absorption des Überstandes bei

450 nm. Für die Berechnung wurde der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{450 \text{ nm}} = 11.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (WHITBY, 1953) zugrundegelegt.

Eine weitere Möglichkeit zur Ablösung des FAD von Enzymprotein bestand in einer 5-minütigen Inkubation des Enzyms in Gegenwart von 2 % SDS bei 60 °C. Die FAD-Konzentration wurde ebenfalls durch die Absorption bei 450 nm berechnet.

Die enzymatische FAD-Bestimmung mit der D-Aminosäure Oxidase (MASSEY und CURTI, 1966) beruht darauf, daß das Apoenzym der D-Aminosäure mit FAD zum aktiven Holoenzym rekombiniert. Aktivitätsmessungen der D-Aminosäure Oxidase wurden mit einer Sauerstoffelektrode durchgeführt; die FAD-Konzentration der Proben und der Reaktivierungsgrad der apo-D-Aminosäure Oxidase wurden über eine Eichkurve korreliert.

f) Sulphydrylgruppen Analyse

Das Reagenz 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) wurde von ELLMAN (1959) zum Nachweis von Thiolgruppen entwickelt. Nach der Vorschrift von HABEEB (1972) wurden die Gesamt-Sulphydrylgruppen (nach Denaturierung mit SDS) und die durch das Reagenz "erreichbaren" Sulphydrylgruppen der nativen Alkoholoxidase photometrisch bestimmt.

g) Extraktion und Dünnschichtchromatographie von Aromaten

Die Extraktion und Konzentrierung aromatischer Verbindungen folgte der Vorschrift von YAJIMA et al., (1979):
1 ml wässriger Lösung (Enzymreaktions-Ansätze, zellfreie Extrakte) wurden mit 0.1 ml 20 % (V/V) H_2SO_4 und 25 mg Natriumdithionit versetzt und zweimal mit 3 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und unter Stickstoffbegasung zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 0.1 ml Essigsäureäthylester aufgenommen und auf Kieselgel chromatographiert (Kieselgel 60

F₂₅₄ DC-Fertigplatten mit Konzentrierungszone, Merck). Als Laufmittel wurden verwendet:

I. Benzol, Dioxan, Essigsäure, 195:25:4

II. Dibuthyläther, Essigsäure, 10:1.

h) Aminosäureanalyse

Für die Aminosäureanalyse wurde das gereinigte Enzymprotein 20 Stunden bei 110 °C in evakuierten, zugeschmolzenen Ampullen hydrolysiert. Das Hydrolat wurde in einem Beckman Multichrom Aminosäure-Analysator analysiert.

i) Analytische Ultrazentrifugation zur Molekulargewichtsbestimmung

Sedimentations-Gleichgewichts Ultrazentrifugationen erfolgten in einer analytischen Ultrazentrifuge (Beckman, Spinco E), die mit einem Monochromator und photoelektrischem Scanner ausgerüstet war. Die Alkoholoxidase war in 0.01 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7.6 gelöst, und Proteinkonzentrationen wurden durch die Absorption bei 280 nm gemessen.

III. Ergebnisse

1. Vorkommen von C₁-oxidierenden Enzymen in einigen holzzer- setzenden Pilzen

Die zellfreien Extrakte einiger holzversetzender Basidiomyceten enthielten, neben der Alkoholoxidase, eine Formaldehyd Dehydrogenase und eine Formiat Dehydrogenase (Tab. 2). Mit Hilfe dieser drei Enzyme kann Methanol bis zum CO₂ oxidiert werden. Die Aktivitäten der Formaldehyd Dehydrogenasen waren von reduziertem Glutathion abhängig; für die Formaldehyd Dehydrogenasen Methanol-verwertender Hefen ist Glutathion ebenfalls ein essentieller Cofaktor (SAHM, 1977).

Tab. 2: Intrazelluläres Vorkommen C₁-oxidierender Enzyme in einigen höheren Pilzen, die auf Komplettnährmedium kultiviert wurden.

Organismus	Alkohol- oxidase	Formaldehyd Dehydrogenase	Formiat Dehydrogenase
<i>Pleurotus ostreatus</i>	±	+	+
<i>Poria contigua</i>	+++	+++	+++
<i>Lenzites abietina</i>	+	++	-
<i>Chaetomium piluliferum</i>	-	-	-
<i>Polystictus versicolor</i>	-	-	-
<i>Bjerkandera adusta</i>	-	+++	+
<i>Polyporus obtusus</i>	+	+	+
<i>Polyporus adustus</i> 28312	++	+	+
<i>Polyporus adustus</i> 28315	+	±	±
<i>Schizophyllum commune</i>	+	+	±
<i>Agrocybe aegerita</i>	-	+	±

Die Nährstoffansprüche der verschiedenen Pilzarten sind sehr unterschiedlich, was auf ihre parasitische oder saprophytische Lebensweise zurückgeführt werden kann. Diese Organismen sind zumeist auxotroph bezüglich einzelner oder mehrerer Vitamine und

Aminosäuren; sie können außerdem Spezialisierungen gegenüber der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und in Bezug auf die Assimilierbarkeit von Schwefel ausgebildet haben (MÜLLER und LOEFFLER, 1971; WORGAN, 1968). Für den Weißfäulepilz *Polyporus obtusus* und den Braunfäulepilz *Poria contigua* wurde versucht, mit einem definierten Nährmedium sowohl das Wachstum als auch die Produktion der interessierenden Enzyme zu optimieren (Tab. 3).

Tab. 3: Wachstum (11 - 14 Tage) von *Poria contigua* und *Polyporus obtusus* auf verschiedenen Substraten. Es wurde das semi-synthetische Medium (s.II.3.) unter Zugabe der angegebenen C- und N-Quellen verwendet.

C-Quelle (1 %)	N-Quelle (g/l)	CH ₃ OH (0.5 %)	<i>Poria contigua</i>		<i>Polyporus obtusus</i>
			Alkoholoxidase (U/mg)	(%)	Alkoholoxidase (U/mg)
Glukose	2	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.092	9	-
	+ 1	NaNO ₃			
Glycerin	"	-	0.057	6	-
Succinat	"	-	-	-	kein Wachstum
Mannit	"	-	0.005	0.5	-
Glukose	"	+	0.114	11	-
Glycerin	"	+	0.205	20	-
Succinat	"	+	-	-	kein Wachstum
Mannit	"	+	0.013	1.3	-
Glukose	"	-	-	-	-
	- Hefeextrakt				
Glukose	1	NaNO ₃	0.240	24	0.003
Glukose	2	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.137	14	-
Glukose	2	NH ₄ NO ₃	0.101	10	-
Glukose	2.3	Asparagin	1.010	100	0.004
Cellobiose	"	-	0.330	33	nicht getestet
Komplettmedium			2.3		0.7
			(9 Tage Wachs-		(20 Tage Wachs-
			tum)		tum)

In einem semisynthetischen Mineralsalzmedium (+ 0.5 g/l Hefeextrakt) waren Glukose als Kohlenstoff- und Asparagin als Stickstoffquelle die günstigste Kombination der getesteten Substrate. Die Zugabe von Methanol führte zu keiner signifikanten Steigerung der Alkoholoxidase-Aktivitäten der Kulturen. Das Wachstum und die Alkoholoxidase-Aktivitäten waren in allen Ansätzen geringer als auf Kompletmedium. Der Weißfäulepilz *Polyporus obtusus* zeigte unter diesen Bedingungen keine oder nur sehr geringe Enzymaktivitäten. Keiner der untersuchten Pilzstämmen konnte Methanol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten, obwohl bei der Oxidation des Methanols zu CO_2 2 NADH gewonnen werden können.

Das Wachstum von Basidiomyceten in Submerskultur erfolgt unter Bildung von pellets (METZ und KOSSEN, 1977) verschiedener Größe und Anheftung flächiger Mycelien an die Gefäßwandungen. Diese uneinheitliche Wachstumsform erschwerte eine reproduzierbare Kultivierung der Organismen und führte, trotz standardisierter Animpfverfahren, zu zeitlichen Verschiebungen des Wachstums und der Enzymbildung der Kulturen. Der Wachstumsverlauf des Braunfäulepilzes *Poria contigua* und das Auftreten von C_1 -oxidierenden Enzymaktivitäten ist in Abbildung 10 a dargestellt. Als Wachstumsparameter diente das Myceltrockengewicht jeweils eines 100 ml-Kulturansatzes; ein paralleler Ansatz wurde zur Bestimmung intrazellulärer Enzymaktivitäten geerntet. Das Erscheinen der Alkoholoxidase-Aktivität in der stationären Wachstumsphase bei pH-Werten >6 ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von KERWIN und RUELIUS (1969), und bestätigte sich auch für die anderen, in dieser Arbeit untersuchten Basidiomyceten. Ein weiterer, für alle untersuchten Stämme gültiger Befund war, daß, solange Glukose in den Nährmedien vorhanden war, keine Alkoholoxidase-Aktivitäten nachgewiesen werden konnten. Eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese der für die Wachstumskurve verwendeten zellfreien Mycelextrakte (Abb. 10 b) läßt den Schluß zu, daß der Glukose-Effekt auf die Alkoholoxidase nicht auf der Ebene enzymatischer Inhibition, sondern auf einer Katabolit-Repression der Enzymsynthese beruht. Den Einfluß verschiedener Substanzen

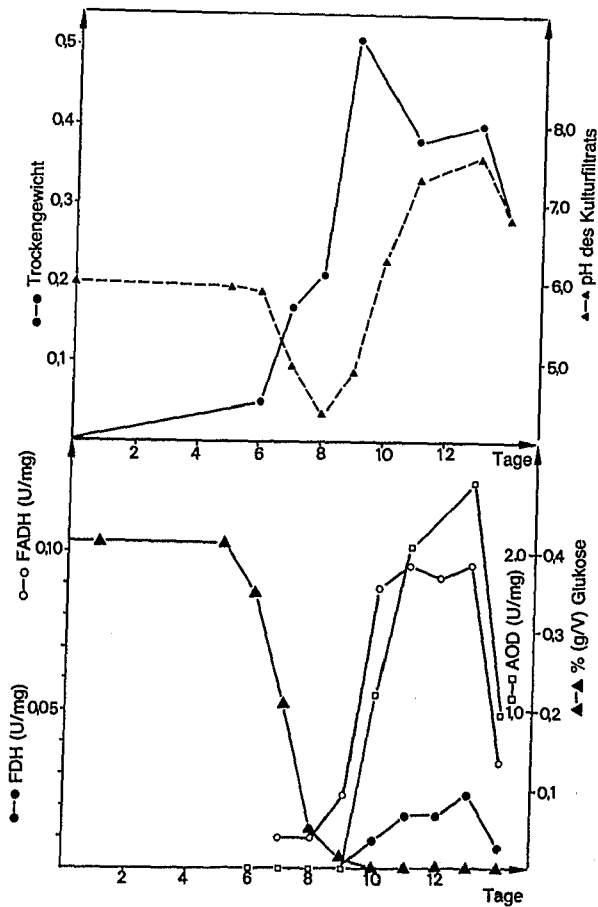


Abb. 10 a: Wachstum und Enzymproduktion von *Poria contigua*. In Abständen von einem Tag wurden in zellfreien Extrakten der auf Kompletmedium gewachsenen Mycelien die Enzymaktivitäten bestimmt (AOD: Alkoholoxi-dase, FADH: Formaldehyd Dehydrogenase, FDH: Formiat Dehydrogenase); jeweils ein paralleler Kulturansatz wurde für die Trockengewichtsbestimmung verwendet. Die Glukose-Konzentrationen in den Kulturlösungen wurden mit einem Glukose-Analysator (Beckman) er-mittelt.

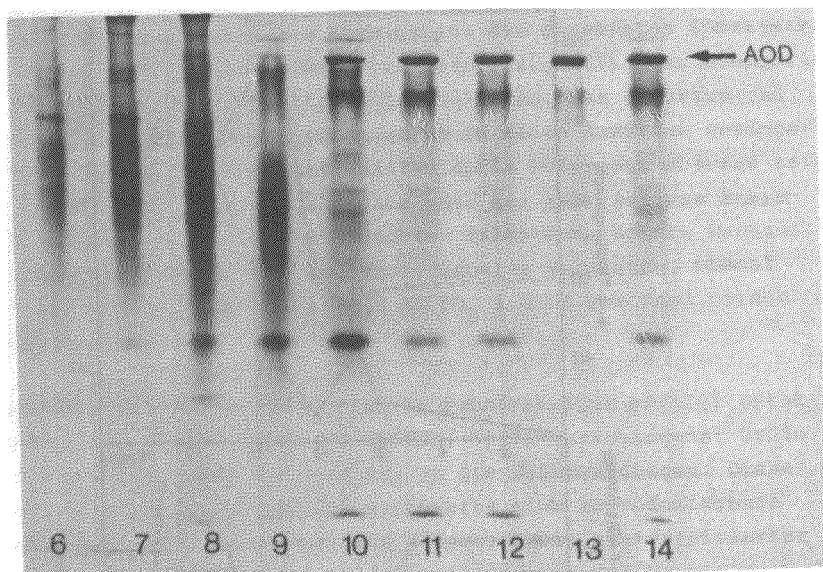


Abb. 10 b: Polyacrylamidgel-Elektrophorese der für die Wachstumskurve verwendeten zellfreien Mycelextrakte. Die mit einem Pfeil gekennzeichnete Proteinbande entspricht der Alkoholoxidase.

auf die Bildung der Alkoholoxidase zeigten Mycelübertragungsexperimente von Glukose-haltigen Medien in die jeweiligen Testmedien (Tab. 4). Vanillinsäure, als häufigstes Produkt des mikrobiellen Ligninabbaus (KIRK et al, 1977), wurde in diese Untersuchungen einbezogen. In Abwesenheit einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle, wie Glukose oder Cellobiose, hatte Vanillinsäure einen deutlich steigernden Einfluß auf die Alkoholoxidase-Aktivitäten der Kulturen. Dieses Ergebnis war interessant im Zusammenhang mit der von HAIDER und TROJANOWSKI (1978) gemachten Beobachtung, daß die Gegenwart der Zucker Glukose, Cellobiose und Xylose die Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$, insbesondere aus den

Tab. 4: Mycelübertragungsexperimente mit *Poria contigua*. 4 Tage alte, auf Komplettnutrientmedium gewachsene Kulturen ohne Alkoholoxidase-Aktivität wurden auf obige Medien übertragen und nach 28 Stunden geerntet.

Medium	relative Aktivität der Alkoholoxidase (%)
Hefeextrakt, 0.4 %; Malzextrakt, 1 %; Glukose, 1 %	0
Hefeextrakt, 0.4 %; Malzextrakt, 1 %; Cellobiose, 1 %	0
Hefeextrakt, 0.4 %; Malzextrakt, 1 %	0
Hefeextrakt, 0.4 %; Malzextrakt, 1 %; Methanol, 0.5 %	2
0.9 % NaCl-Lösung	17
Hefeextrakt, 0.4 %; Malzextrakt, 1 %; Vanillinsäure, 0.05 %	100

Tab. 5: Enzymaktivitäten der Alkoholoxidase, Formaldehyd Dehydrogenase (FADH) und Formiat Dehydrogenase (FDH); Kulturdauer: 14 Tage. Abspaltung von Methoxylgruppen aus DHP-Lignin in 14 Tagen (HAIDER und TROJANOWSKI, 1978).

	Abspaltung von -OCH ₃ -Gruppen (%)	Alkohol- oxidase (U/mg)	FADH (U/mg)	FDH (U/mg)
<i>Merulius lacrymans</i>	2.3	-	0.047	0.002
<i>Merulius silvester</i>	0.7	-	0.025	0.004
<i>Poria monticola</i>	1.8	-	-	-
<i>Poria vaporaria</i>	2.3	-	0.160	0.011
<i>Poria contigua</i>	12.8	1.32	0.129	0.033
<i>Lenzites trabea</i>	24.1	1.20	0.065	0.005
<i>Lenzites sepiaria</i>	2.9	0.02	0.012	0.005
<i>Lenzites abietina</i>	15.9	0.10	0.079	0.008

Methoxylgruppen ^{14}C -markierten DHP-Lignins, hemmt. Mit dieser Gruppe der von HAIDER und TROJANOWSKI bearbeiteten Pilze wurden deshalb die C_1 -oxidierenden Enzyme getestet (Tab. 5). Dabei zeigte sich, daß die Stämme, die am besten die Methoxylgruppen aus DHP-Lignin abspalten, auch die höchsten Alkoholoxidase-Aktivitäten aufwiesen. Diese Experimente können als ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Methoxylgruppen-Abspaltung aus Lignin und dem Vorhandensein von C_1 -oxidierenden Enzymen gewertet werden.

2. Isolierung der Alkoholoxidase

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung der Alkoholoxidase aus *Poria contigua* dienten 9 - 10 Tage auf Komplettnährmedium gewachsene Kulturen. Das Alkoholoxidase-Enzymprotein machte ca. 4.5 % des Gesamtproteins von zellfreien Extrakten dieser Mycelien aus. Mit Ausnahme der Aussalzungsschritte, die bei 0°C durchgeführt wurden, fanden die Enzymreinigungen bei 4°C statt.

a) Aus den braungefärbten zellfreien Extrakten mit Proteinkonzentrationen von 5 - 10 mg/ml präzipitierte das Enzym zwischen 55 - 70 %-iger Ammoniumsulfatsättigung der Lösung. Hierzu wurde den zellfreien Extrakten langsam und unter Rühren Ammoniumsulfat bis zur 55 %-igen Sättigung zugesetzt und das gefällte Protein durch Zentrifugation (20 min, 48 000 g) entfernt. Nach weiterer Zugabe von Ammoniumsulfat zum klaren Überstand bis zur 70 %-igen Sättigung und zweistündiger Gleichgewichtseinstellung wurde das ausgesalzene Protein abzentrifugiert, in einem kleinen Volumen 0.05 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5 aufgenommen und 16 Stunden gegen drei Wechsel des gleichen Puffers dialysiert. Während der Fällungen wurde der pH mit einer 10 %-igen Ammoniaklösung auf 7.5 gehalten. Die Alkoholoxidase aus *Poria contigua* ließ sich durch diese Methode mit relativ guten Ausbeuten 6 - 8-fach anreichern (Tab. 6, 7).

Tab. 6: Fraktionierte Aussalzung der Alkoholoxidase aus *Poria contigua* mit Ammoniumsulfat
(n.b. = nicht bestimmt)

	Volumen (ml)	Protein (mg)	Gesamt- aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung -fach
zellfreier Extrakt	150	647	602	0.93	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fraktionen						
0 - 55 % Sättigung:						
Überstand	172	n.b.	514		85.4	
Präzipitat	150	516	83	0.16	13.8	0.2
55 - 70 % Sättigung:						
Überstand	175	n.b.	19		3.2	
Präzipitat	10.8	66.5	492	7.40	81.7	8

Tab. 7: Reinigung der Alkoholoxidase aus *Poria contigua*

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Gesamt- aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung -fach
zellfreier Extrakt	250	1554	1476	0.95	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fraktion						
55 - 70 % Sättigung	19	167	1144	6.85	77.5	7.2
Präp. Polyacrylamid						
Elektrophorese	35	34	702	20.67	47.6	21.8

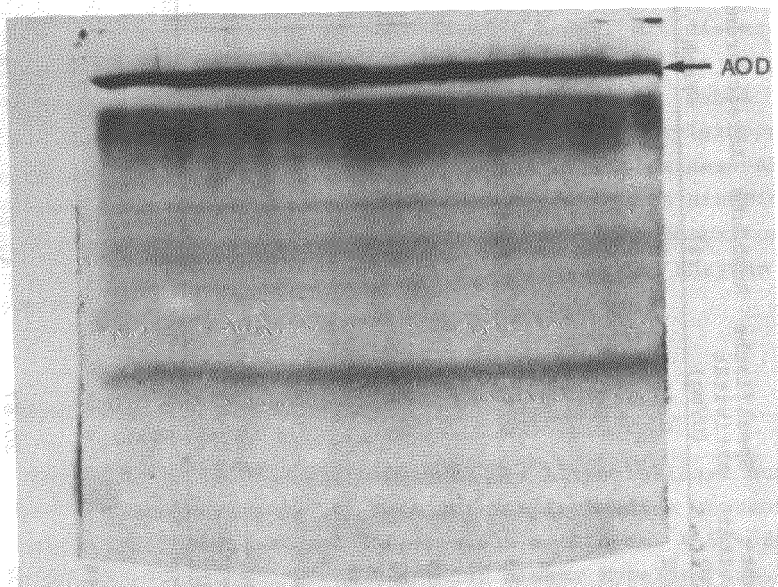


Abb. 11: Coomassie-angefärbter Papierabdruck eines präparativen Polyacrylamid Gels. AOD: Alkoholoxidase-Proteinbande

b) Zur weiteren Reinigung des Enzyms eignete sich die präparative Polyacrylamid-Gel Elektrophorese mit 7 %-igen Gelen, da unter den verwendeten Bedingungen die Alkoholoxidase nur ca. 1 cm in die Gele einwanderte. Bis zu 5 ml (40 - 50 mg Protein) der durch die Salzfällung vorgereinigten Enzymlösung wurde auf ein Flachgel aufgetragen und 15 - 16 Stunden elektrophoretisch getrennt. Die lange Elektrophoresedauer führte zu einer guten Abtrennung der Fremdproteine und erlaubte ein sauberes Ausschneiden der Enzymbande (Abb. 11). Nach der Elution der Alkoholoxidase aus dem Gel, Dialyse und Einengung über einem Ultrafilter UM 10 war das Enzym ca. 20-fach angereichert (Tab. 7) und erwies sich als elektrophoretisch rein (Abb. 12). Auf diese Weise gereinigte Enzympräparate zeigten eine einheitliche Sedimentation bei analytischen Ultrazentrifugationen (s. III.3.).

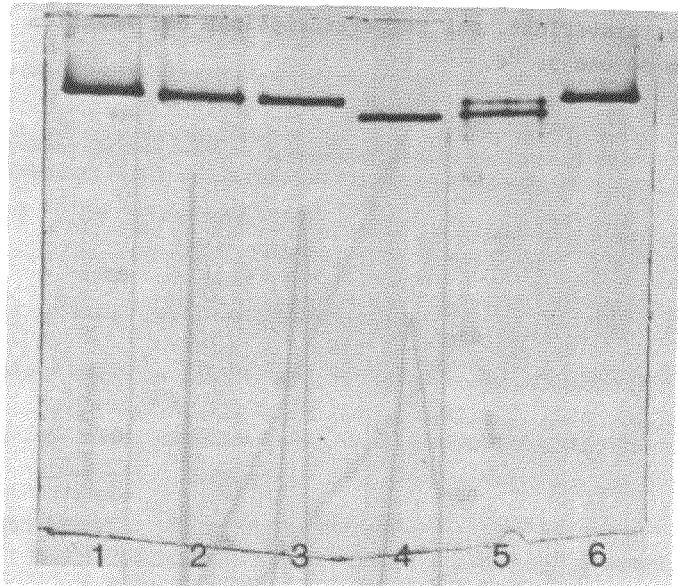


Abb. 12: Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese gereinigter Alkoholoxydasen aus *Portia contigua* (1,6), *Lenzites trabea* (2), *Polyporus adustus* (3), *Candida boidinii* (4) und *Polyporus obtusus* (5).

Die geringe elektrophoretische Beweglichkeit der Alkoholoxydase ließ auf ein hohes Molekulargewicht des Enzyms schließen. Daher wurde versucht, das Enzym durch Zentrifugation in Saccharose-Dichtegradienten (GOLDTHWAITE und BOGORAD, 1971) zu reinigen (Abb. 13). Ausgehend von dem Produkt der Ammoniumsulfatfällung, führte auch diese Methode zu einheitlichen Enzympräparaten, deren spezifische Aktivität der des elektrophoretisch gereinigten Enzyms entsprach. Die Lagerung des Enzyms bei 4 °C in Gegenwart von Natriumazid (0.01 % in 0.05 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5) führte über einen Zeitraum von zwei Wochen zu keinem wesentlichen Aktivitätsverlust. Das Einfrieren bei -20 °C und Auftauen hatte einen Aktivitätsverlust von ca. 24 % zur Folge. Die Alkoholoxydase aus *Portia contigua* hatte ein breites pH-Optimum zwischen 7 - 9. Während das Enzym sehr alkalistabil war, führten pH-Werte unter 6.5 zu einem raschen und irreversiblen

Aktivitätsverlust. Das Temperaturoptimum der Reaktion lag zwischen 30 und 35 °C.

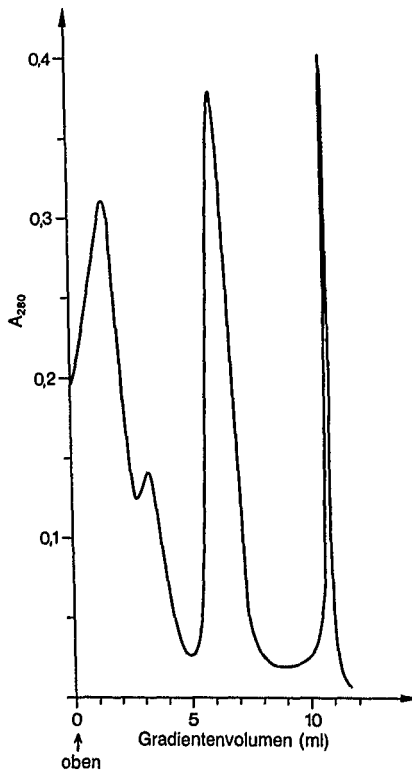


Abb. 13: Elutionsprofil eines Saccharose Gradienten zur Reinigung der Alkoholoxidase aus *Poria contigua*. Das Enzym wurde zwischen 5.0 und 8.0 ml des Gradientenvolumens eluiert.

Der Literaturvergleich spezifischer Aktivitäten von Alkoholoxidasen aus verschiedenen Organismen ist schwierig, da gezeigt wurde, daß die Aktivität des Enzyms, bedingt durch den hohen K_m -Wert für Sauerstoff, stark von dem Sauerstoffgehalt der Testlösung abhängig ist (VAN DIJKEN et al., 1976) (Abb. 14). Daher

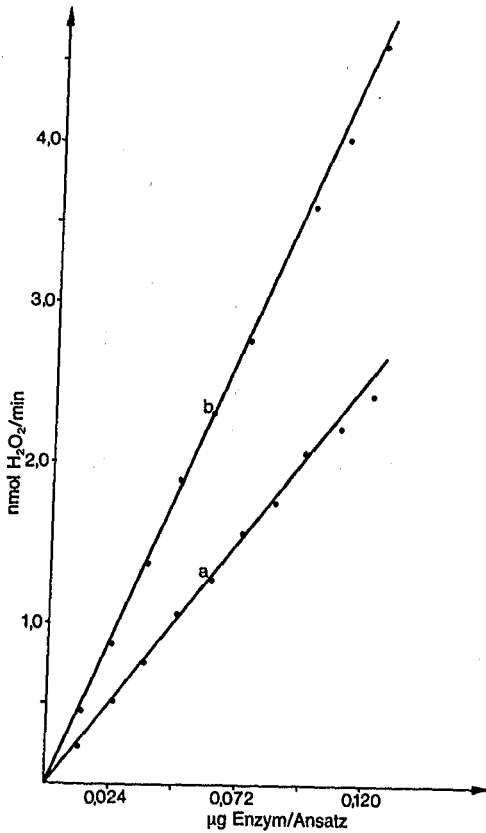


Abb. 14: Abhängigkeit der Alkoholoxidase aus *Poria contigua* von dem Sauerstoffgehalt der Testlösungen. a) Testlösung Luftsauerstoff-äquibriert, b) Testlösung mit reinem Sauerstoff begast.

wäre zu einem exakten Vergleich von Alkoholoxidase-Aktivitäten die Kenntnis der Testbedingungen notwendig. In dieser Arbeit wurden Aktivitätsmessungen mit luftäquibrierten Lösungen durchgeführt; Bestimmungen spezifischer Aktivitäten waren mit einem Fehler von $\pm 5\%$ reproduzierbar. In Tabelle 8 sind einige Literaturwerte für spezifische Aktivitäten verschiedener Alkoholoxidasen zusammengefaßt und die Werte, die für die in dieser

Arbeit isolierten Enzyme bestimmt wurden. Der Reinheitsgrad der Präparationen ist aus Abbildung 12 ersichtlich.

Tab. 8: Spezifische Aktivitäten verschiedener Alkoholoxidasen
[†]Präparat nicht-einheitlich

Alkoholoxidase gereinigt aus	U/mg Protein	Literatur- angabe in	
<i>Kloeckera</i> sp.	11.0	U/mg Protein	TANI et al. 1972 a
<i>Candida boidinii</i>	3.4	U/mg Protein	SAHM und WAGNER, 1973
<i>Candida</i> sp.	3.5	79.1 μ l O ₂ min · mg Prot.	FUJII und TONOMURA, 1972
<i>Hansenula polymorpha</i>	57.9	U/mg Protein	VAN DIJKEN, 1976
<i>Polyporus</i> sp.	25.1	157 U/mg N	JANSSEN und RUE- lius, 1968
<i>Poria contigua</i>	20.0		diese Arbeit
<i>Lenzites trabea</i>	22.0		"
<i>Polyporus obtusus</i> [†]	5.8		"
<i>Polyporus adustus</i>	10.5		"
<i>Candida boidinii</i>	7.4		"

Die in dieser Arbeit unter gleichen Bedingungen gemessenen Aktivitäten zeigen, daß Alkoholoxidasen aus verschiedenen Organismen unterschiedliche Stabilitäten oder Aktivitäten aufweisen.

Zu Vergleichszwecken wurden Anreicherungsgänge für die Alkoholoxidasen eines weiteren Vertreters der Braunfäule-Pilze, *Lenzites trabea*, der zwei Weißfäule-Erreger *Polyporus obtusus* und *Polyporus adustus* (ATCC 28315) und der Methanol-verwertenden Hefe *Candida boidinii* durchgeführt.

Die Isolierung der Alkoholoxidase aus *Lenzites trabea* verlief analog der aus *Poria contigua*; Ausgangsmaterial waren 15 Tage gewachsene Kulturen. Ebenfalls durch Ammoniumsulfatfällung und Elektrophorese wurde das Enzym aus *Candida boidinii* isoliert.

Die Fällungsgrenzen lagen hier zwischen 30 - 80 %-iger Ammoniumsulfatsättigung. Die Alkoholoxidase-Aktivitäten der zellfreien Extrakte betrugen im Mittel 1.0 U/mg Protein. Zellfreie Extrakte von *Polyporus adustus* hatten nach 14-tägigem Wachstum der Kulturen Enzymaktivitäten von 0.5 - 0.8 U/mg Protein. Der Ammoniumsulfatfällung (30 - 70 %) und Elektrophorese wurde eine Säulenchromatographie an Sephacryl S-300 angeschlossen (Abb. 15).

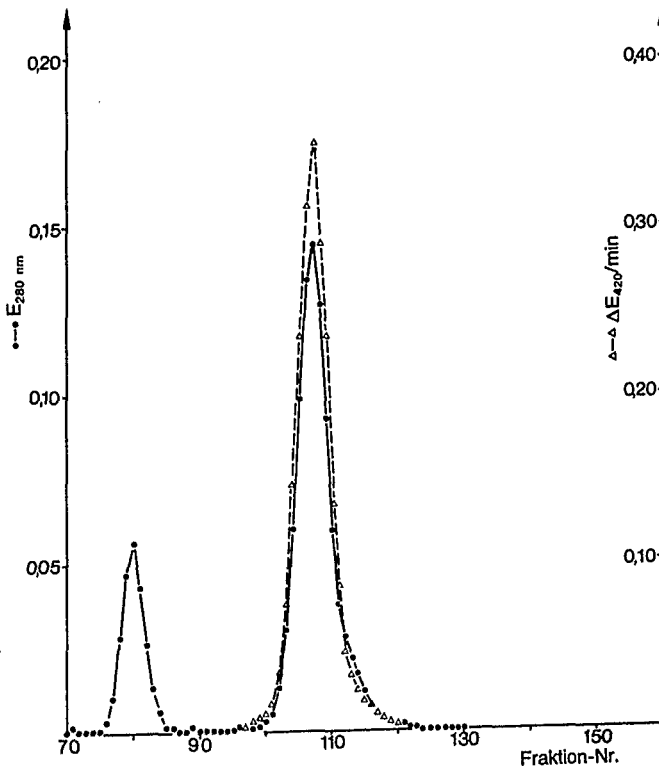


Abb. 15: Chromatographie eines vorgereinigten Alkoholoxidase-Präparates aus *Polyporus adustus* an Sephacryl S-300. Säule: 2.6 x 80 cm; Elutionspuffer: 0.02 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7.5, mit 0.1 M KCl und 0.01 % NaN_3 ; Druck: 30 cm H_2O ; Durchfluß: 10 ml/h; Fraktionsgröße: 1.8 ml

Polyporus obtusus zeigte erst nach einer Kulturdauer von 20 Tagen Alkoholoxidase-Aktivität in zellfreien Extrakten (0.3 - 0.7 U/mg Protein). Es wurden die gleichen Anreicherungs-schritte wie für das Enzym aus *Polyporus adustus* durchgeführt, die jedoch ein nicht-einheitliches Präparat ergaben (Abb. 16, 12).

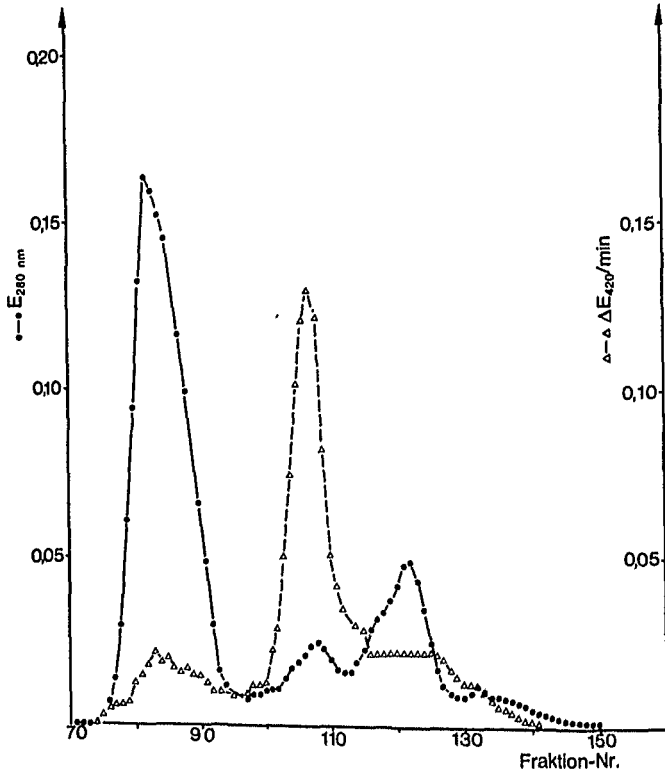


Abb. 16: Chromatographie eines vorgereinigten Alkoholoxidase-Präparates aus *Polyporus obtusus* an Sephadex S-300. Bedingungen s. Abb. 15

3. Charakterisierung der Alkoholoxidase aus *Poria contigua*

Molekulargewicht und Aufbau der Untereinheiten

Die zur Reinigung des Enzyms anwendbaren Techniken ließen auf ein hohes Molekulargewicht schließen, wie es auch für die Alkoholoxidasen aus Hefen gefunden wurde (SAHM, 1977). Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Alkoholoxidase aus *Poria contigua* wurde die Sedimentationsgleichgewichts-Methode angewendet. Die Zentrifugation erfolgte bei 4000 Upm und 5 °C. Nach SVEDBERG und PEDERSEN (1959) wurde das Molekulargewicht aus semilogarithmischen Auftragungen der Absorption gegen das Quadrat des Abstandes zum Rotationszentrum ($\ln c = f(r^2)$) und der Annahme eines partiellen spezifischen Volumens von 0.75 cm³/g, auf 610 000 ± 500 berechnet. Der Sedimentationskoeffizient $s_{w,20} = 21.5 \pm 0.1$ wurde durch Sedimentationsanalysen mehrerer Enzymkonzentrationen bei 30 000 Upm und 18.7 °C bestimmt.

In Gegenwart des anionischen Detergenz Natrium-Dodecylsulfat sind die elektrophoretischen Beweglichkeiten von Polypeptiden dem Logarithmus ihrer Molekulargewichte proportional (WEBER und OSBORN, 1969). Wie aus Abbildung 17 ersichtlich ist, ließ sich das Molekulargewicht der in den Gelen als eine Bande wandernden Alkoholoxidase-Untereinheiten (Abb. 32) auf 79 000 bestimmen, wenn man sie in die Auftragung: Beweglichkeit = f (log Molekulargewicht) einiger Eichproteine einordnete. Innerhalb der Fehlergrenzen war das ein Achtel des Wertes, der für das Molekulargewicht des nativen Enzyms gefunden wurde. Daraus folgt, daß die Alkoholoxidase aus *Poria contigua* ein oktameres Enzym ist, dessen Untereinheiten bezüglich ihres Molekulargewichtes identisch sind.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten dieses Untereinheitenmodell. Abbildung 18 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme eines negativ angefärbten Alkoholoxidase-Präparats. In Abhängigkeit von ihrer Lage in der Abbildungsebene

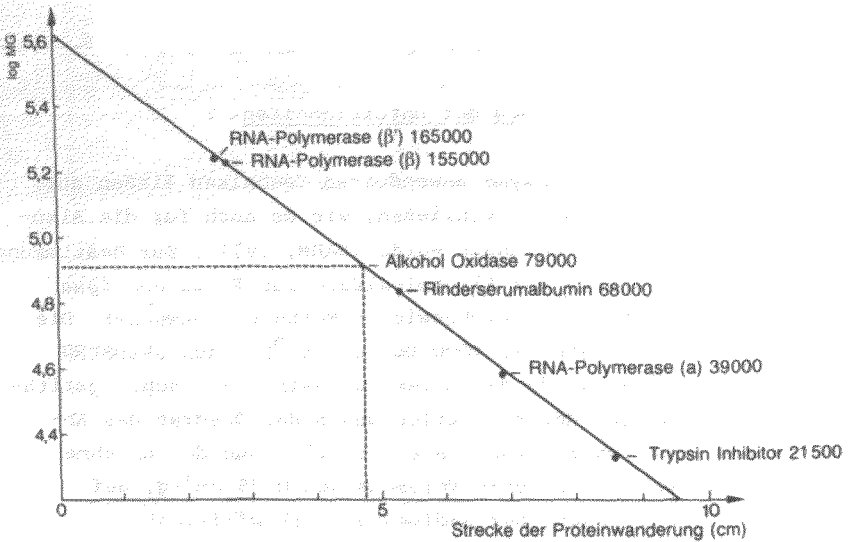


Abb. 17: Molekulargewichtsbestimmung der Alkoholoxidase-Untereinheiten durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von Natrium Dodecylsulfat. (Gelsystem nach WEBER und OSBORN, 1969; Eichproteine von Boehringer, Mannheim)

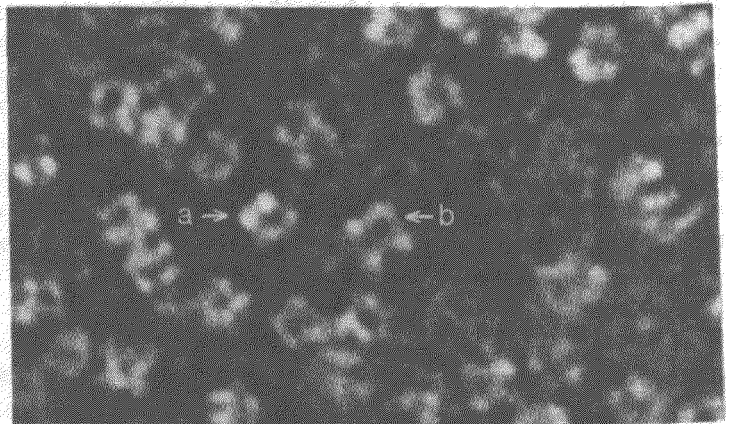


Abb. 18: Elektronenmikroskopisches Bild der Alkoholoxidase aus *Portia contigua*. Das Enzym war mit Uranylacetat negativ anfärbt. a) Molekül erscheint zweigeteilt; b) Molekül erscheint viergeteilt.

erschieden die Moleküle zwei- oder viergeteilt, woraus sich eine dreidimensionale Struktur zweier, im Viereck angeordneter, übereinanderliegender Tetramere ableiten ließ. Dieses Modell wurde von KATO et al., (1976) auch für die Alkoholoxidasen der Hefen *Hansenula polymorpha* und *Kloeckera sp.* beschrieben.

Absorptionsspektrum und Identifizierung der prosthetischen Gruppe

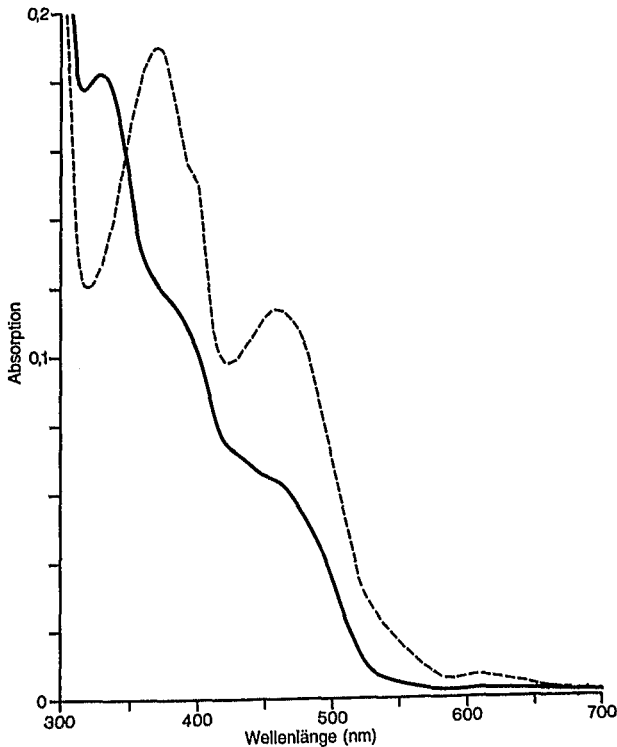


Abb. 19: Absorptionsspektren der Alkoholoxidase aus *Poria bonitigua* (—) und *Candida boidinii* (---). Die Konzentrationen waren: 2.0 mg/ml des *Poria*-Enzyms und 1.6 mg/ml *Candida*-Enzyms. Die Alkoholoxidasen waren in 0.1 M Natriumphosphat Puffer, pH 7.5, gelöst.

Die native Alkoholoxidase aus *Poria contigua* hatte im sichtbaren Spektrum Absorptionsmaxima bei 330 und 455 nm, mit einer Schulter bei 380 nm (Abb. 19). Dieses Spektrum unterschied sich deutlich von denen der Alkoholoxidasen aus Hefen (SAHM und WAGNER, 1973a; TANI et al., 1972 b). Ein Einfluß der Reinigungstechnik auf das Absorptionsspektrum der Alkoholoxidase aus *Poria contigua* konnte ausgeschlossen werden, da das in dieser Arbeit durch die gleiche Methode isolierte Enzym aus *Candida boidinii* ein Absorptionsspektrum zeigte, welches den Literaturangaben entsprach. Die Maxima lagen bei 370 und 467 nm, mit einer Schulter bei 395 nm (Abb. 19). Die Spektren der gereinigten Alkoholoxidasen aus *Lenzites trabea* und *Polyporus adustus* glichen dem des *Poria*-Enzyms.

Das Differenzspektrum des *Poria*-Enzyms zwischen oxidiertem und substratreduziertem Zustand war das eines Flavins (Abb. 20). Das durch Hitzedenaturierung aus dem Enzym extrahierte Flavin konnte dünnschichtchromatographisch als FAD identifiziert werden (Tab. 9).

Tab. 9: Identifizierung der prostethischen Gruppe der Alkoholoxidase aus *Poria contigua*

Substanz	R _F in Laufmittel I	R _F in Laufmittel II
Riboflavin	0.58	0.41
FMN	0.40	0.14
FAD	0.20	0.11
Enzymextrakt	0.20	0.11

Die zur Quantifizierung des FAD angewendeten Methoden ergaben Werte zwischen 7.3 und 8.0 mol FAD/mol Enzym (Tab. 10, Abb. 21). Es kann deshalb angenommen werden, daß jede der acht Enzymuntereinheiten ein FAD enthält.

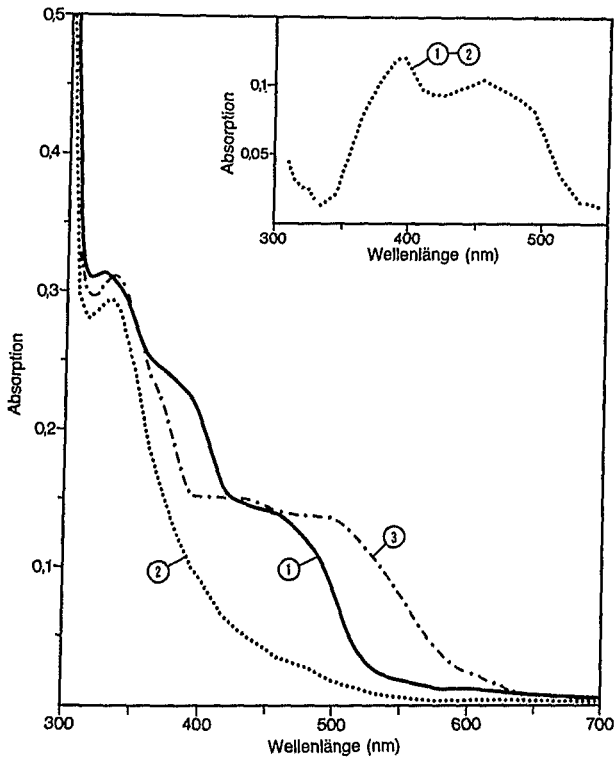


Abb. 20: Spektren der Alkoholoxidase aus *Poria contigua* im oxidierten (1) und substratreduzierten (2) Zustand, und Differenz dieser Spektren (1)-(2). Absorptionsspektrum des Enzyms in der Gegenwart von 1.5 mM Natriumazid (3). Die Enzymkonzentration war 2.9 mg/ml 0.1 M Natriumphosphat Puffer, pH 7.5.

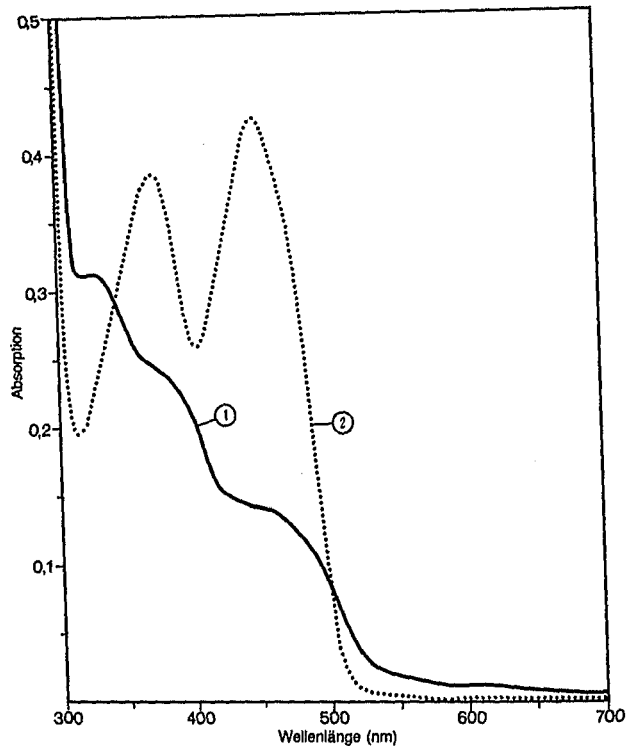


Abb. 21: Spektrum der Alkoholoxidase aus *Poria contigua*, aerob (1) und nach Inkubation mit 2 % Natrium Dodecylsulfat (5 min, 60 °C) (2). Die Enzymkonzentration war 3.050 mg/ml Natriumphosphat Puffer, pH 7.5.

Das Absorptionsspektrum der Alkoholoxidase war den Spektren von Ferroflavoproteinen ähnlich (KOMAI et al., 1969); die Eisenbestimmung mit der Bathophenanthrolin Methode verlief jedoch negativ. Ebenso konnten auch mit der Metallspurenanalyse durch Atomabsorptions- und Atomemissionsmessungen nur substöchiometrische Mengen der Metalle Eisen und Zink nachgewiesen werden.

Tab. 10: Quantifizierung des FAD-Gehaltes der Alkoholoxidase

Methode	$\frac{\text{mol FAD}}{\text{mol Enzym}}$
Hitzedenaturierung, E 450	7.3
SDS-Denaturierung, E 450	7.5
Apo-D-Aminosäure Oxidase	8.02

Für die Interpretation des Absorptionsspektrums der Alkoholoxidase aus *Poria contigua* sind weitere Analysen, bezüglich anderer Metalle, notwendig.

Substratspezifität

Die Alkoholoxidase katalysiert die Oxidation verschiedener kurzkettiger, primärer aliphatischer Alkohole. Die apparenten Michaeliskonstanten und Maximalgeschwindigkeiten (Tab. 11) zeigten, daß die Affinität zu Methanol am größten war und mit zunehmender Kettenlänge der Substrate abnahm. Die Oxidation von Formaldehyd durch das Enzym beruht darauf, daß Formaldehyd in wäßrigen Lösungen zu 99 % hydratisiert vorliegt und so ein dem Methanol ähnliches Molekül darstellt (BIEBER und TRÜMLER, 1947). Geringe Aktivität zeigte das Enzym mit den Substraten Isopropyl Alkohol, Benzyl Alkohol und 2-Mercaptoäthanol, während 2-Propin-1-ol relativ gut umgesetzt wurde. Wegen der erwähnten Sauerstofflimitierung der Alkoholoxidase-Testsysteme muß betont werden, daß die in Tabelle 11 angegebenen Werte nur für die hier benutzten Testbedingungen gültig sind und hauptsächlich dem Vergleich von Substrataffinitäten dienen. Sowohl die Michaeliskonstanten als auch die Maximalgeschwindigkeiten sind von der Sauerstoffkonzentration abhängig; in Sauerstoff-begasten Lösungen war die Affinität zu Methanol schlechter und der V_{\max} -Wert höher. Dieser Effekt wurde von VAN DIJKEN et al., (1976) mit der Alkoholoxidase aus *Hansenula polymorpha* genauer untersucht.

Tab. 11: Substratspezifität der Alkoholoxidase aus *Poria contigua*. Die Oxidation von 2-Mercaptoäthanol wurde mit der Sauerstoffelektrode gemessen; für alle anderen Substrate wurde die Freisetzung von Wasserstoffperoxid gemessen. Die apparenten K_m und V_{max} -Werte wurden nach der Gleichung von LINEWEAVER und BURK (1934) bestimmt und die Koordinatenschnittpunkte durch lineare Regression ermittelt. (n.b. = nicht bestimmt)

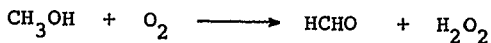
Substrat	Apparenter Wert von	
	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$) (nmol Protein) $^{-1}$
Methanol	0.2	12.8
Äthanol	1.0	12.0
1-Propanol	8.3	9.4
1-Butanol	21.3	n.b.
Isopropyl Alkohol	25.0	n.b.
2-Propin-1-ol	3.2	7.5
Formaldehyd	6.1	1.9
2-Mercaptoäthanol	27.2	n.b.

Die Stöchiometrie der durch das Enzym katalysierten Methanol-oxidation wurde durch Messung der Wasserstoffperoxid- und Formaldehyd-Freisetzung und des Sauerstoffverbrauchs ermittelt. Dabei wurde der Substratumsatz möglichst klein gehalten, um die Linearität der Reaktion in allen Bestimmungsansätzen zu gewährleisten (Tab. 12).

Tab. 12: Stöchiometrie der Methanoloxidation.
Das Volumen aller Ansätze betrug 3 ml. Je 20 μl Alkoholoxidase-Lösung (0.052 mg Protein/ml) wurden nach 40- und 200-facher Verdünnung für die Bestimmungen eingesetzt.

eingesetztes Methanol (μmol)	Sauerstoff- verbrauch (nmol)	Wasserstoffperoxid- freisetzung (nmol)	Formaldehyd- freisetzung (nmol)
300	3.6	3.9	3.3
300	18.0	20.7	17.9

Die erhaltenen Werte weisen auf eine einfache Reaktionsstöchiometrie nach der Gleichung



hin und sind in Übereinstimmung mit den Reaktionsgleichungen, die für Alkoholoxidasen aus Hefen beschrieben wurden (SAHM und WAGNER, 1973 a; TANI et al., 1972 a).

Inhibitoren

Die Sulfhydrylgruppen-Analyse nach ELLMAN (1959) ergab 3.9 mol -SH/mol Enzym "erreichbare" Sulfhydrylgruppen und 16.1 mol -SH/mol Enzym nach SDS-Denaturierung. Die 100%-ige Inhibition der Alkoholoxidase durch das Sulfhydryl-Reagenz p-Chlormercuribenzoat (1 mM) zeigte, daß Cysteinreste für die Katalyse oder Strukturhaltung des Enzyms essentiell sind. Natrium Cyanit (1 mM) wirkte auch bei niedrigen Methanol-Konzentrationen nicht inhibierend auf die Enzymaktivität. Aktivitätsmessungen in Gegenwart von p-Chlormercuribenzoat und Natrium Cyanit wurden mit der Sauerstoffelektrode durchgeführt, da die kolorimetrische H_2O_2 -Bestimmung durch diese Substanzen gestört wurde.

Natriumazid hemmt die Alkoholoxidase kompetitiv mit Methanol. Der K_i -Wert wurde nach DIXON (1953) auf 0.02 mM bestimmt (Abb. 22). In Abwesenheit von Methanol bewirkte die Zugabe von Azid (1.5 mM) eine Farbänderung der Enzymlösung von gelb nach rot (Abb. 20). Die Verdrängung des Azids vom Enzym durch einen Überschuß an Methanol zeigte sich auch am Spektrum, welches in dieselbe substratreduzierte Form überging, wie in Abwesenheit von Azid (Abb. 20).

VAN DIJKEN (1976) isolierte eine rote und gelbe Alkoholoxidase aus der Hefe *Hansenula polymorpha* in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen des Organismus; trotz ihrer unterschiedlichen Absorptionsspektren waren die kinetischen Eigenschaften der beiden Enzympräparationen sehr ähnlich.

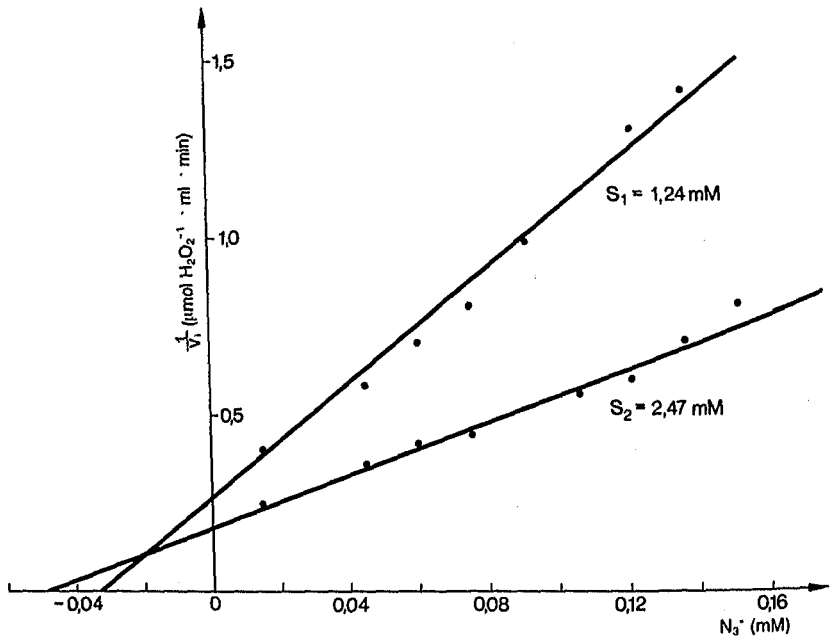


Abb. 22: DIXON -Auftragung für die Alkoholoxidase aus *Poria contigua*, mit Methanol als Substrat und Natriumazid als kompetitiven Inhibitor mit einem K_i -Wert von 0.02 mM. Die Enzymaktivität wurde durch Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Freisetzung unter Standardbedingungen gemessen.

Aminosäureanalyse

Die Aminosäure-Zusammensetzung der Alkoholoxidase aus *Poria contigua* und die zweier Alkoholoxidasen aus Hefen sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

Tab. 13: Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung der Alkohol-oxidasen aus *Poria contigua* und aus den Methanol-verwertenden Hefen *Hansenula polymorpha* und *Kloeckera sp.* ⁺Kato et al., (1976). (n.b. = nicht bestimmt)

Aminosäure	<i>Poria contigua</i> Rest/79000 g	<i>Hansenula</i> ⁺ <i>polymorpha</i> Rest/83000 g	<i>Kloeckera sp.</i> ⁺
Lysin	39	39	44
Histidin	22	21	19
Arginin	33	39	38
Asparaginsäure	74	106	94
Theronin	43	50	43
Serin	29	56	53
Glutaminsäure	46	64	73
Prolin	43	50	47
Glycin	82	64	66
Alanin	51	41	48
Valin	45	35	29
Methionin	11	12	13
Isoleucin	28	29	24
Leucin	48	52	48
Tyrosin	22	31	38
Phenylalanin	17	36	32
Halb-Cystin	n.b.	15	13
Tryptophan	n.b.	11	17

Die Alkoholoxidase aus *Poria contigua* enthält einen deutlich geringeren Anteil der sauren Aminosäuren Glutamin- und Asparaginsäure, dagegen mehr Glycin als die Hefe-Enzyme. Das kann eine Erklärung dafür sein, daß trotz sehr ähnlicher Molekulargewichte das *Poria*-Enzym eine geringere elektrophoretische Beweglichkeit hatte, als die Alkoholoxidasen aus Hefen (Abb. 12, 31). Weitere Unterschiede ergaben sich in den Anteilen von Serin und Phenylalanin, während die übrigen Aminosäure-Zusammensetzung der drei Enzyme sehr ähnlich war.

4. Elektronenmikroskopische Lokalisierung der Katalase und Alkoholoxidase in *Poria contigua*

Der Begriff Microbody wird zur morphologischen Bezeichnung von Zellorganellen verwendet, die von einer einzelnen Membran umgeben sind und eine Mittelstellung zwischen dem Sedimentationsverhalten der Mitochondrien und der mikrosomalen Fraktion einnehmen (DE DUVE und BAUDHUIN, 1966). Der Durchmesser von Microbodies beträgt 0.2 - 1.5 μm . Als Peroxisomen sind solche Microbodies definiert, die a) Oxidasen enthalten, welche molekularen Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduzieren und dabei ein Substrat RH_2 oxidieren und b) Katalase enthalten, die das Zellgift H_2O_2 zu H_2O umsetzt (DE DUVE und BAUDHUIN, 1966; DE DUVE, 1969; TOLBERT, 1971). Peroxisomen sind sowohl in Tier- und Pflanzenzellen (MASTERS und HOLMES, 1977) als auch bei Mikroorganismen (SAHM, 1977; MAXWELL, 1977) weit verbreitet. Daher wurde untersucht, ob die Alkoholoxidase, als H_2O_2 -produzierendes Enzym, auch bei Basidiomyceten, zusammen mit der Katalase, in Peroxisomen lokalisiert ist.

Mit Kulturen von *Poria contigua* wurde ein zeitlich paralleles Ansteigen intrazellulärer Alkoholoxidase- und Katalase-Aktivitäten gemessen. Zellfreie Extrakte 10 - 12 Tage gewachsener Mycelien enthielten hohe Aktivitäten beider Enzyme (Tab. 14).

Tab. 14: Alkoholoxidase- und Katalase-Aktivitäten in zellfreien Extrakten von *Poria contigua*

Kultivierung (Tage)	Alkoholoxidase (U/mg)	Katalase (kU/mg)
3	0.00	0.000
6	0.00	0.006
10	1.37	1.754
12	2.87	2.977

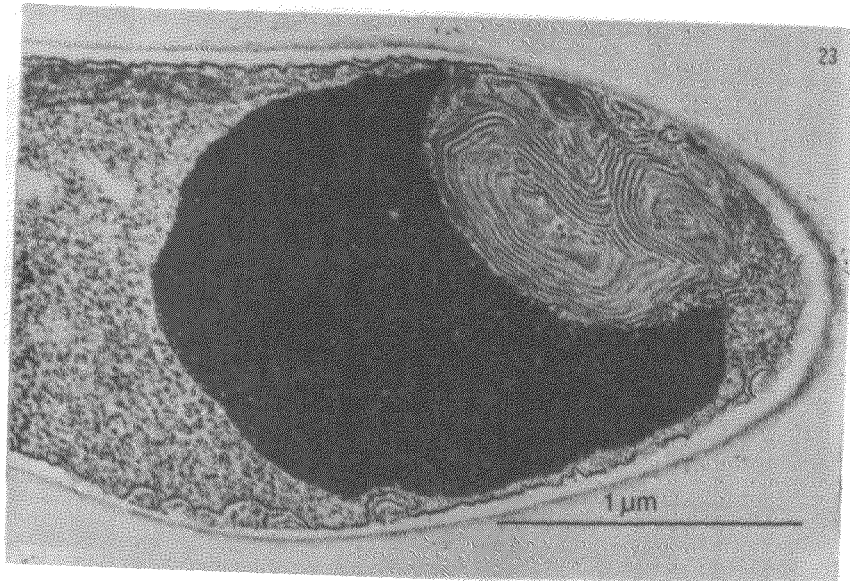
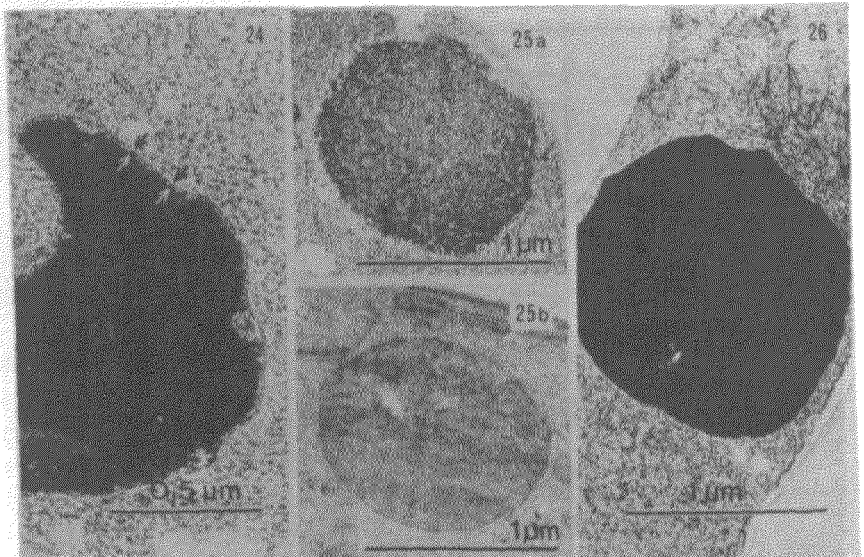


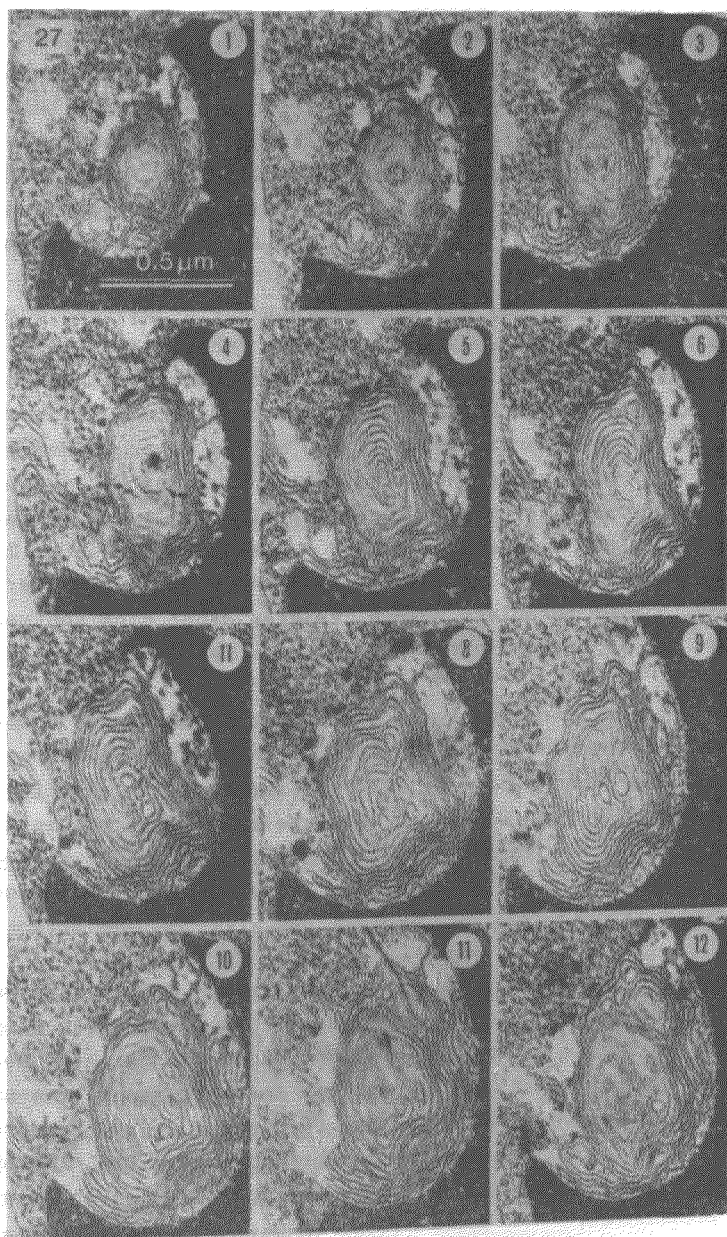
Abb. 23: Anfärbung der Katalase in einem Microbody von *Poria contigua* durch das elektronendichte DAB-Reaktionsprodukt. In der Einwölbung an der oberen rechten Seite des Microbodies sind dichtgepackte Membranen zu erkennen.

Zellen solcher Kulturen, bei denen die cytochemische Anfärbung der Katalase mit der DAB-Methode vorgenommen wurde, zeigten im elektronenmikroskopischen Bild das kontrastgebende DAB-Oxidationsprodukt in Einschlüssen von 0.5 - 1.5 µm Durchmesser (Abb. 23). Diese Einschlüsse waren von einer einzelnen Membran umgeben (Abb. 23, 24) und konnten als Microbodies klassifiziert werden. Positive DAB-Reaktionen wurden nur bei Zellen älterer (> 6 Tage) Kulturen von *Poria contigua* beobachtet. Die Anfärbung der Alkoholoxidase führte ebenfalls zu einer elektronenoptisch kontrastreichen Matrix der Microbodies (Abb. 26), die jedoch,



- Abb. 24: DAB-positiv angefärbter Microbody, bei dem die Begrenzungsmembran der Organelle sichtbar ist.
- Abb. 25 a: Bild eines Microbodies nach Inkubation der Zellen mit DAB ohne H_2O_2 .
- Abb. 25 b: Microbody, nach Fixierung der Zellen mit OsO_4 und Anfärbung mit Uranylacetat und Bleicitrat.
- Abb. 26: Microbody mit rundem äußerem Umriss, nach Behandlung der Zellen mit Methanol und DAB.
- Abb. 27: Seriendünnschnitte durch eine Membran-Einwölbung eines DAB-positiven Microbodies. Die Höhe des Einschlusses ist ca. 0.6 μm bei einer Schnittdicke von 50 nm. Weiße Nummern bezeichnen die Sequenz der Dünnschnitte.

Im Gegensatz zu Microbodies aus Hefezellen (VAN DIJKEN et al., 1975), keine kristalloiden Strukturen erkennen ließ.



In Kontrollexperimenten wurden Alkoholoxidase- und Katalase-aktive Zellen in Abwesenheit von Substrat (H_2O_2 oder Methanol) mit DAB inkubiert. Die entsprechenden elektronenmikroskopischen Bilder waren insgesamt etwas kontrastreicher (Abb. 25 a) als die von DAB-unbehandelten, mit Glutaraldehyd fixierten Zellen (Abb. 25 b); im Vergleich zu den in Gegenwart von Substrat inkubierten Proben, war die Matrix dieser Microbodies jedoch deutlich heller. Die Inhibition der Katalase stellte eine weitere Kontrollmöglichkeit der enzymatischen Oxidation des DAB dar. Um sicherzustellen, daß die Katalase aus *Poria contigua* durch den von HEIM et al., (1956) beschriebenen Inhibitor 3-Amino-1,2,4-Triazol hemmbar ist, wurden Aktivitätsmessungen mit zellfreien Extrakten in Gegenwart des Inhibitors (50 mM) bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen (1, 10 mM) in einer O_2 -Meßzelle durchgeführt. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion wurden durch Aminotriazol nur zu 60 % gehemmt; eine 100 %-ige Inhibition der Katalase setzte erst nach 3 - 5 Minuten ein (Abb. 28). Die Microbodies von Zellen, die mit DAB und H_2O_2 in Gegenwart von Aminotriazol inkubiert wurden, zeigten daher eine kontrastreichere Matrix als die oben beschriebenen DAB-Kontrollen.

In Zell-Dünnschnitten von *Poria contigua* erschienen die äußeren Umrisse der Microbodies überwiegend als entweder nierenförmig (Abb. 23) oder rund (Abb. 25, 26), was auf eine nierenartige dreidimensionale Form schließen läßt. Beide Umrisse können aus derselben Organelle abgeleitet werden, wenn die Schnittebene entweder senkrecht oder parallel zur Achse der Microbodies gelegt wird.

Als strukturelle Besonderheiten wurden mit den Microbodies vergesellschaftete Membransysteme beobachtet (Abb. 23, 27). Eine direkte Verbindung zwischen diesen Membranen und der Microbody-Membran konnte jedoch auch anhand von Seriendünnschnitten nicht nachgewiesen werden (Abb. 27). Eine Verbindung der Microbody-Membran mit dem Endoplasmatischen Retikulum, wie von MAXWELL et al., (1975) für *Neurospora crassa* beschrieben, wurde ebenfalls nicht beobachtet.

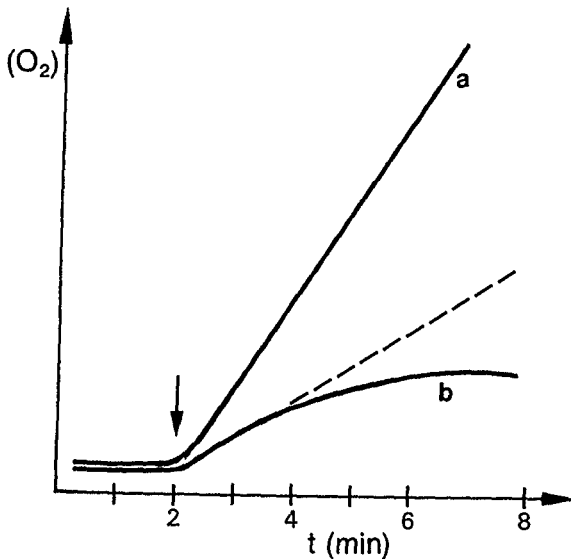


Abb. 28: Hemmung der Katalase in zellfreien Extrakten von *Poria contigua* durch 3-Amino-1,2,4-Triazol. Testansatz (Messung mit einer Sauerstoffelektrode): 150 μ mol Tris-HCl Puffer, pH 7.0, 30 μ mol H_2O_2 in 3 ml; die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l Enzymlösung gestartet (Pfeil). a) In Abwesenheit, b) in Gegenwart von 150 μ mol Aminotriazol.

5. Immunologische Untersuchungen

Mit jeweils monospezifischen Antikörpern gegen die Alkoholoxidase aus *Poria contigua* und *Candida boidinii* wurde die serologische Verwandtschaft von Alkoholoxidasen aus verschiedenen Organismen durch Diffusionstechniken untersucht. Diese Experimente sollten Auskunft darüber geben, ob sich die Basidiomyceten- und Hefeenzyme einerseits, und die der Weiß- und Braunfäulepilze andererseits, serologisch unterscheiden lassen. In Anbetracht der nur wenig genau definierten Parameter für die Zuordnung holzzersetzender Pilze in die Gruppen der Weiß- und Braunfäulepilze erschien letzterer Aspekt interessant.

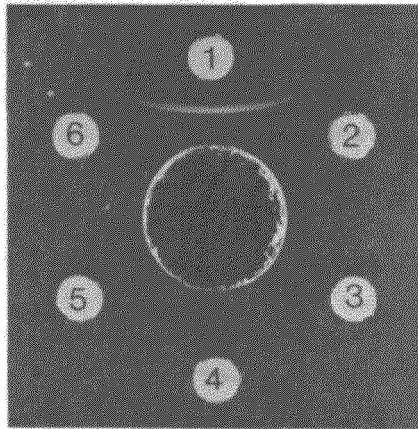


Abb. 29 a: Immunodoppeldiffusionstest mit Antiserum gegen die Alkoholoxidase aus *Candida boidinii*. Alkoholoxidasen aus *Candida boidinii* (1), *Poria contigua* (2) (6), *Lenzites trabea* (3), *Polyporus obtusus* (4) und *Polyporus adustus* (5).

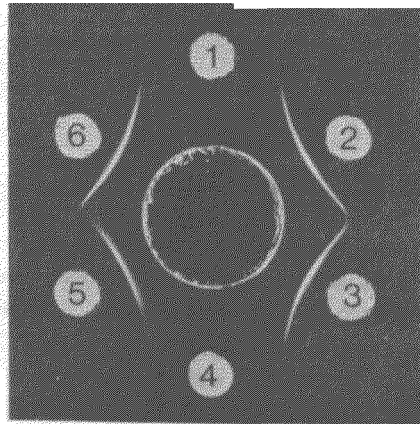


Abb. 29 b: Immunodoppeldiffusionstest mit Antiserum gegen die Alkoholoxidase aus *Poria contigua*. Anordnung der Proben wie in a.

Die gegen die Alkoholoxidase aus *Candida boidinii* gerichteten Antikörper reagierten mit keiner der Alkoholoxidasen aus Basidiomyceten (Abb. 29 a); das Enzym in zellfreien Extrakten von *Hansenula polymorpha* präzipitierte mit diesen Antikörpern (Immunreaktion partieller Identität, Abb. 30). Umgekehrt reagierten die Alkoholoxidasen der zwei Hefen nicht mit dem Antiserum gegen das *Poria*-Enzym (Abb. 29 b). Während also die Alkoholoxidasen aus Hefen mit denen der Basidiomyceten nicht kreuzreagierten, war die serologische Unterscheidung der hier untersuchten Weiß- und Braunfäule-Erreger anhand der Immunreaktion ihrer Alkoholoxidasen nicht so eindeutig möglich: die Enzyme der Braunfäulepilze *Poria contigua* und *Lenzites trabea* zeigten identische Immunreaktionen; mit zellfreien Extrakten oder angereicherten Enzympräparaten des Weißfäulepilzes *Polyporus obtusus* konnte keine Immunpräzipitation beobachtet werden, und die Alkoholoxidase des ebenfalls den Weißfäulepilzen zugeordneten *Polyporus adustus* reagierte partiell identisch mit der *Poria*-Alkoholoxidase (Abb. 29 b).

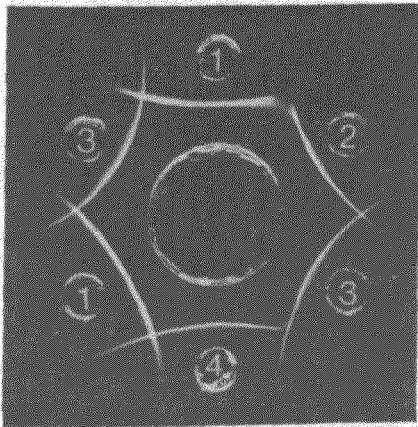


Abb. 30: Immundoppeldiffusionstest der Alkoholoxidasen der Pilze *Poria contigua* (1) und *Lenzites trabea* (2) und der Hefen *Candida boidinii* (3) und *Hansenula polymorpha* (zellfreier Extrakt, 4). Das zentrale Loch enthielt gleiche Mengen der Antiseren gegen die Alkoholoxidase aus *Poria contigua* und aus *Candida boidinii*.

Die Immunodiffusion der Alkoholoxidasen aus den Pilzen *Poria contigua* und *Lenzites trabea* und der Enzyme der Hefen *Candida boidinii* und *Hansenula polymorpha* gegen beide Antiseren (Abb. 30) zeigt, daß nebeneinander aufgetragene Proben (a) bei serologischer Identität eine durchgehende Präzipitationslinie bildeten (Proben 1 und 2), (b) bei partieller Identität eine Spornbildung in Richtung des schlechter reagierenden Antigens eintrat (Proben 3 und 4), und (c) sich kreuzende Präzipitationslinien bei serologischer Ungleichheit auftraten (Proben 2 und 3, 1 und 4, 1 und 3).

Die Elektrophorese auf einem Agaroseträger (Abb. 31 a) verdeutlichte die verschiedenen elektrophoretischen Beweglichkeiten der Hefe- und Basidiomyceten-Alkoholoxidasen und ließ auch einen kleineren Unterschied zwischen den Mobilitäten der Hefenzyme erkennen. Die einer solchen Elektrophorese folgende Immunodiffusion (Abb. 31 b) bestätigte die oben beschriebenen, mit der OUCHTERLONY (1958) Methode erhaltenen Ergebnisse. Elektrophoresen der hier untersuchten Proben in Gegenwart von Natrium Dodecylsulfat (Abb. 32) erlaubten den Schluß, daß diese Alkoholoxidasen alle oktamere, hochmolekulare Enzyme waren; soweit untersucht, wiesen sie auch vergleichbare kinetische Eigenschaften auf. Es ist daher wahrscheinlich, daß die deutlichen serologischen Unterschiede zwischen den Alkoholoxidasen aus Hefen und Basidiomyceten auf der verschiedenen Aminosäurezusammensetzung der Enzyme beruht.

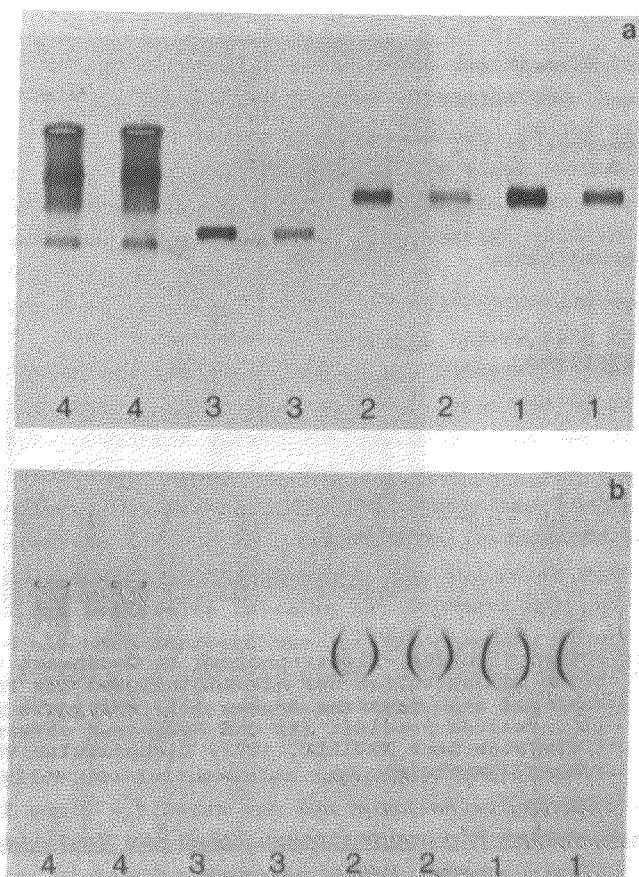


Abb. 31: Immunoelktrophorese der Alkoholoxidase aus *Poria contigua* (1), *Lenzites trabea* (2), *Candida boidinii* (3) und *Hansenula polymorpha* (zellfreier Extrakt, 4). (a) Agarose-Elektrophorese mit nachfolgender Anfärbung der Proteinbanden. (b) Agarose-Elektrophorese, gefolgt von einer Immunodiffusion mit Antiserum gegen die Alkoholoxidase aus *Poria contigua*.

RNA-Polymerase (8,8')
155-165 000

Rinderserumalbumin
68 000

RNA-Polymerase, α
39 000

Trypsin-Inhibitor
21 500

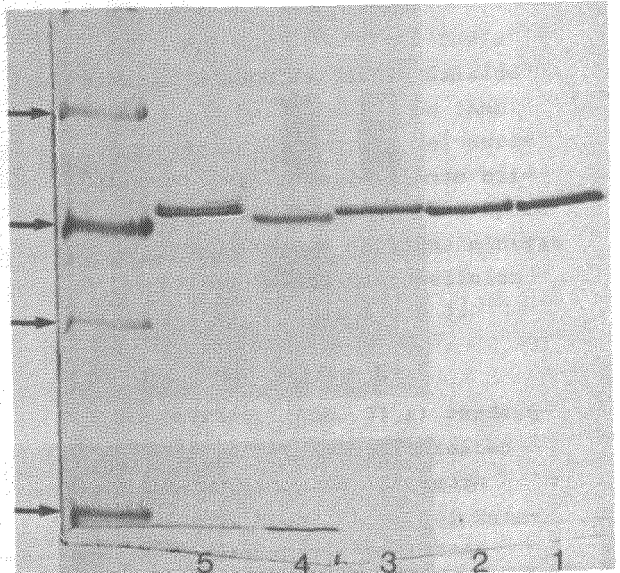


Abb. 32: Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von Natrium Dodecylsulfat der Alkoholoxidasen aus *Poria contigua* (1), *Leucites trabea* (2), *Polyporus adustus* (3), *Candida boidinii* (4) und *Polyporus obtusus* (5). (Gelsystem nach NEVILLE, 1971; Eichproteine von Boehringer, Mannheim).

6. Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Vanillinsäure

Wie aus den vorangegangenen Untersuchungen ersichtlich ist, gehören die C_1 -oxidierenden Enzyme Alkoholoxidase, Formaldehyd Dehydrogenase und Formiat Dehydrogenase zu der Enzymausstattung vieler holzzersetzender Basidiomyceten. Zwei Faktoren, die die Enzymproduktion beeinflussten, wurden gefunden: Glukose, die einen reprimierenden, und Vanillinsäure, die einen stimulierenden Effekt ausübte. Eine Parallelität von Methoxylgruppen-Abspaltungsaktivitäten aus DHP-Lignin und dem Auftreten C_1 -oxidierender Enzyme konnte ebenfalls gezeigt werden (vgl. III.1.). Diese Ergebnisse legten es nahe, den enzymatischen Angriff auf eine

methoxylierte Lignin-Modells substanz durch den Braunfäule-Erreger *Poria contigua* zu untersuchen, um Aufschluß über den Abbauweg und die Art der C₁-Abspaltung zu erhalten. Da die Vanillinsäure (3-Methoxy-4-Hydroxybenzoesäure) als eines der häufigsten metabolischen Produkte des mikrobiellen Ligninabbaus anzusehen ist (KIRK et al., 1977), wurde sie als Substrat verwendet.

Mycelien von *Poria contigua* wurden auf Kompletmedium mit 0.05 % Vanillinsäure angezogen. Nach 4 - 5 Tagen konnte eine Vanillinsäure-Oxidation mit zellfreien Extrakten gemessen werden. Geringere Aktivitäten wurden auch gefunden, wenn die Kulturen ohne Vanillinsäure gewachsen waren. Abbildung 34 zeigt den Verlauf einer Aktivitätsbestimmung in einer O₂-Meßzelle. Die nach Zugabe von NADH einsetzende Sauerstoffabnahme wurde jeweils von dem Gesamtsauerstoffverbrauch (mit NADH und Vanillinsäure) abgezogen. Die NADH-oxidierende Aktivität konnte nur teilweise durch Gel-filtration der zellfreien Extrakte mit Sephadex G-50 beseitigt werden und als noch ineffektiver zur Verminderung dieser Nebensaktivität erwies sich das Dialysieren zellfreier Extrakte. In Abwesenheit von NADH erfolgte keine Oxidation der Vanillinsäure.

Die anfänglich den Kulturmedien zugegebene Vanillinsäure wurde im Verlauf von 5 - 6 Tagen von den Mycelien aufgenommen (Abb. 33), und die Enzymaktivität konnte durch weitere Zugabe von Vanillinsäure zu den wachsenden Kulturen erhöht werden.

Diese Messungen der Vanillinsäure Oxidation gaben noch keinen Aufschluß über die Art der Reaktion. Enzymatische Umsetzungen methoxylierter Benzoesäuren wurden mehrfach in der Literatur beschreiben (Beispiele s. Tab. 15). Angriffspunkt der Oxidation konnte also sowohl die Methoxylgruppe als auch die Carboxylgruppe der Vanillinsäure sein. Im Gegensatz zu der von PASZCZYŃSKI und TROJANOWSKI (1977) gereinigten Veratrat O-Demethylase aus *Xerocomus badius* und *Chaetomium piluliferum* war das Enzym aus *Poria* nicht Sauerstoff-labil und behielt seine Aktivität nach dem Einfrieren bei -20 °C. Die von CARTWRIGHT und BUSWELL (1967) angewendete Ultrazentrifugation zur Anreicherung einer Vanillat

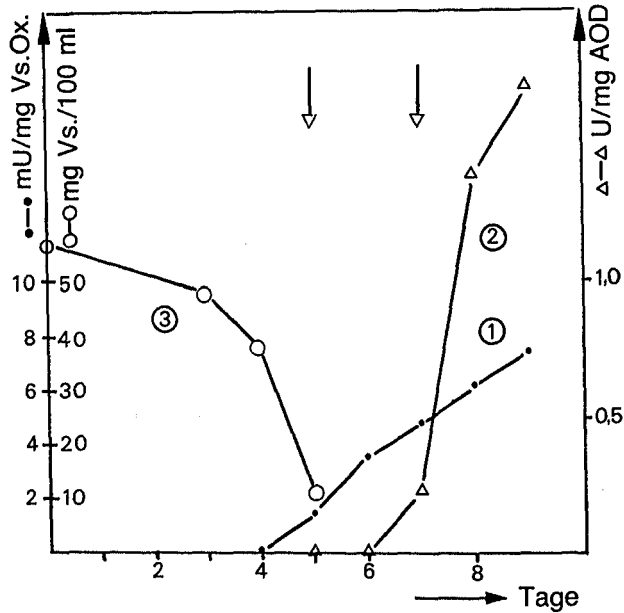


Abb. 33: Vanillinsäure-oxidierende (1) und Alkoholoxidase (2)-Aktivitäten in zellfreien Extrakten verschieden alter Kulturen von *Poria contigua*. Abnahme der Vanillinsäurekonzentration in den Kulturmedien (3). Pfeile bezeichnen die Zeitpunkte erneuter Vanillinsäure-Zugaben (jeweils 0.025 %)

O-Demethylase aus zellfreien Extrakten von *Pseudomonas fluorescens* erwies sich zur Anreicherung des Enzyms aus *Poria* als ungeeignet. Da als Abspaltungsprodukt der Demethylierungen häufig Formaldehyd gefunden wurde (RIBBONS, 1970; BUSWELL und MAHMOOD, 1972; CARTWRIGHT und SMITH, 1967; BERNHARDT et al., 1975) wurde mit Reaktionsansätzen nach 30-minütiger Inkubation die Formalde-

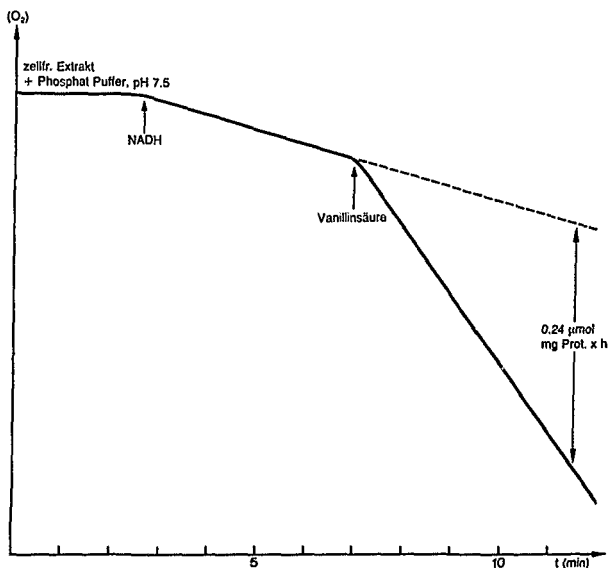
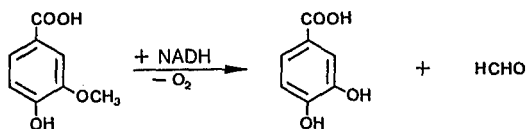
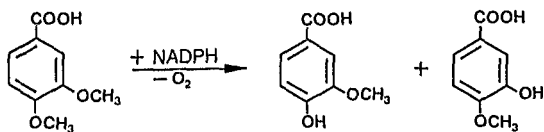


Abb. 34: Messung der Vanillinsäure-Oxidation mit dem zellfreien Extrakt einer 6-Tage Kultur von *Poria contigua*.

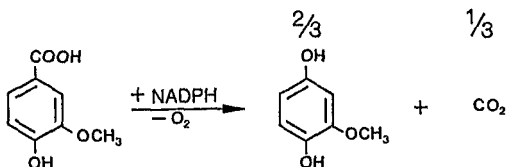
Tab. 15: Beispiele enzymatischer Umsetzungen von methoxylierten Benzoesäuren



Vanillat O-Demethylase
CARTWRIGHT und BUSWELL,
1967
RIBBONS, 1970



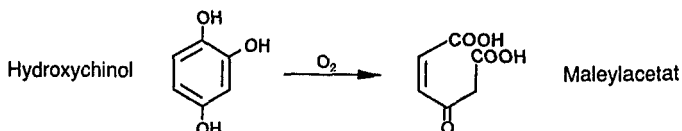
Veratrat O-Demethylase
PASZCZYŃSKI und TROJA-
NOWSKI, 1977



Vanillat Hydroxylase
YAJIMA et al., 1979
BUSWELL et al., 1979

Hydbestimmung nach NASH (1953) durchgeführt. Diese Bestimmungen wurden aber, vermutlich durch die hohen Proteinkonzentrationen der Proben (10 - 15 mg/3 ml Reaktionsansatz) und enzymatische Folge- bzw. Nebenreaktionen, gestört und ergaben keine eindeutigen Aussagen.





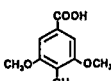






Durch Ammoniumsulfatfällung zwischen 45 und 55%-iger Sättigung mit nachfolgender Dialyse, konnte das Enzym konzentriert und ca. 3-fach aus zellfreien Extrakten angereichert werden. Eine solche Präparation wurde zur Untersuchung der Substratspezifität des Enzyms eingesetzt (Tab. 16). Die erhaltenen Werte gaben eindeutig zu erkennen, daß der Angriffspunkt der enzymatischen Oxidation die Carboxylgruppe dieser Benzoesäure-Derivate war. Eine solche Vanillinsäure Decarboxylase bzw. -Hydroxylase wurde von BUSWELL et al., (1979) und von YAJIMA et al., (1979) aus *Sporotrichum pulverulentum* angereichert (Tab. 15). Die erstaunlich hohe Aktivität des *Poria*-Enzyms mit 2,4-Dihydroxybenzoesäure könnte darauf beruhen, daß gleichzeitig die von BUSWELL und ERIKSSON (1979) beschriebene Reaktion



als Folgereaktion der oxidativen Decarboxylierung der 1,4-Dihydroxybenzoesäure ablief. Substrate mit einer Hydroxylgruppe in p-Position zur Carboxylgruppe wurden relativ gut umgesetzt, während eine p-Methoxylgruppe die Decarboxylierung behinderte. Veratrumsäure war ein schlechtes Substrat der Decarboxylase, induzierte jedoch das Enzym, wenn sie 0.05%-ig dem Kulturmedium zugesetzt wurde.

Die Cofaktoren-Abhängigkeit des Enzyms aus *Poria contigua* (Tab. 17) unterschied sich von der in der Literatur beschriebenen Vanillinsäure Decarboxylasen. Diese sind beide von NADPH abhängig und YAJIMA et al. (1979) fanden einen steigenden Effekt von MgCl_2 auf die Enzymaktivität. Die Aktivität der von YAJIMA et al. (1979) angereicherten Decarboxylase (40 - 60% Ammoniumsulfat-Fällung) betrug 3 nmol Vanillinsäure $\cdot \text{mg Protein}^{-1}$

Tab. 16: Substratspezifität der Vanillinsäure Hydroxylase. Die Konzentration der Substrate war 1 mM.

		Enzymaktivität nmol O ₂ x mg Protein ⁻¹ x min ⁻¹	Aktivität %
	2,4-Dihydroxybenzoat - NADH	25.31 0	100 0
	Protocatechusäure - NADH	8.35 0	33 0
	4-Hydroxybenzoat - NADH	4.51 0	18 0
	Vanillinsäure - NADH	4.38 0	17 0
	Syringasäure	2.72	11
	3-Methoxybenzoat	2.59	10
	4-Methoxybenzoat	2.23	8.8
	Isovanillinsäure	1.12	4.4
	Veratrunsäure	0.80	3.2
	Vanillin	0	0
	Benzylalkohol	0	0

min^{-1} und das von BUSWELL et al., (1979) durch 60 %-ige Ammoniumsulfat-Fällung und präparativer Flachgel-Elektrofokussierung erhaltene Präparat setzte $68.1 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ um. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde versucht, das Enzym weiter anzureichern, da mit zellfreien Extrakten und den Präparaten nach der Ammoniumsulfat-Fällung keine quantitativen Analysen der Substratabnahme und Produktfreisetzung möglich war.

Tab. 17: Abhängigkeit der Vanillinsäure Hydroxylase von einigen Cofaktoren

	Enzymaktivität $\frac{\text{nmol O}_2}{\text{mg Protein} \cdot \text{min}}$	Aktivität (%)
Standard-Testsystem	4.91	100
- NADH	0	0
- NADH, + NADPH (1 mM)	2.23	45
+ MgCl_2 (5 mM)	4.20	86
+ EDTA (5 mM)	5.13	104
+ NaN_3 (5 mM)	5.00	102

Die Produkte der Ammoniumsulfat-Fällung (45 -55 %) mit Proteinkonzentrationen zwischen 25 - 30 mg/ml wurden auf Polyacrylamid-Flachgele aufgetragen, mit denen nach der Elektrophorese, Coomassieblau- oder Aktivitätsanfärbungen (s. II.5.f) durchgeführt wurden (Abb. 35). Aktivitätsanfärbungen, für die die Gele mit NADH und Vanillinsäure vorinkubiert wurden, zeigten mehrere, als Aufhellungszonen sichtbare Banden. Durch Vorinkubation der Gele nur mit NADH und nachfolgender Tetrazoliumblau-Anfärbung konnten einige Banden als "NADH Oxidasen" außer Betracht gelassen werden. Dann wurden aus einem präparativen Gel die noch nicht identifizierten Banden ausgeschnitten, eluiert und mit den dialysierten Eluaten Aktivitätsbestimmungen durchgeführt. Bei den folgenden Isolierungen mit präparativen Polyacrylamid-Gelen konnte der Bereich der Vanillinsäure Hydroxylase-Protein-

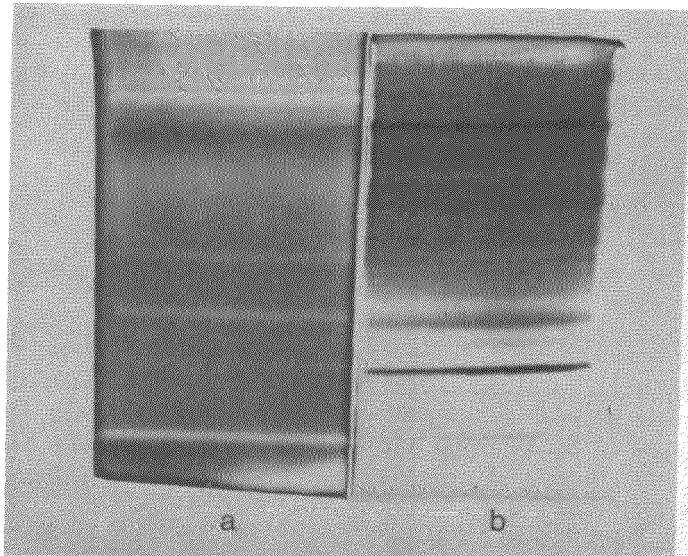


Abb. 35: Polyacrylamidgel, nach der Elektrophorese mit Coomassieblau anfärbt (b); Aktivitätsanfärbung eines Gels (a).

bande reproduzierbar anhand von Coomassieblau-angefärbten Papierabdrücken lokalisiert werden. Abbildung 36 (Bande 3) zeigt, daß dieses Verfahren zu einem schon sehr sauberen Präparat führte; die so gewonnenen Proben hatten jedoch nur geringe spezifische Aktivitäten ($4 - 5 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Die Inaktivierung des Enzyms durch die Elektrophorese war wegen der positiven Aktivitätsanfärbung und der von BUSWELL et al., (1979) durchgeführten Elektrofokussierung nicht zu erwarten, konnte aber nicht ausgeschlossen werden. Der Aktivitätsverlust des Enzyms könnte auf die Abtrennung spezifischer Cofaktoren (Metallionen, Salze etc.) während der Reinigung zurückzuführen sein. Komplementationsversuche, wie z.B. die Mischung des reinen Enzyms mit zellfreien Extrakten, wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

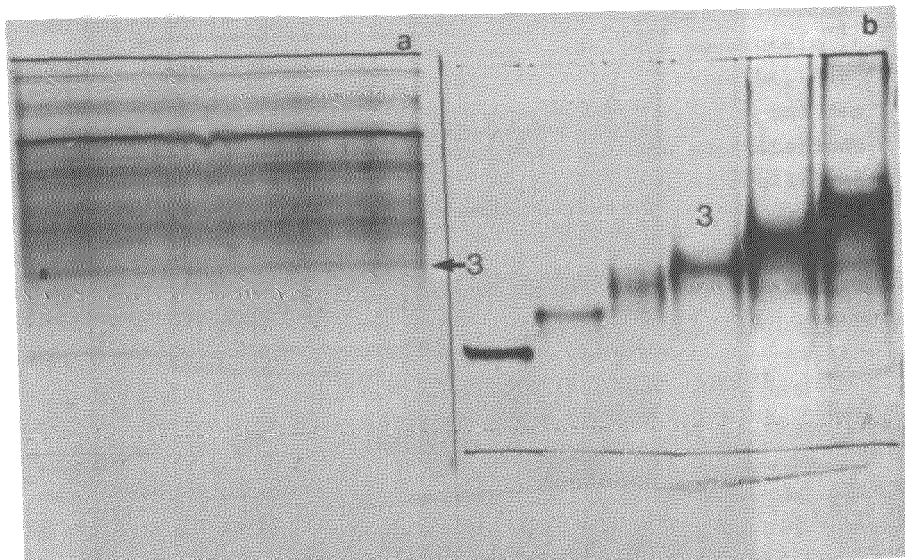


Abb. 36: Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophoresen. (a) Elektrophorese des Produktes der Ammoniumsulfat-Fällung; (b) Re-Elektrophorese der aus einem präparativen Gel eluierten Proteinbanden. Bande 3 entspricht der Vanillinsäure Hydroxylase-Proteinbande.

Der qualitative Nachweis des Produktes der enzymatischen Vanillinsäure-Oxidation konnte durch Extraktion von 30 min inkubierten Ansätzen mit Essigsäureäthylester, und Dünnschichtchromatographie erbracht werden (Abb. 37). Der nach der Reaktion zusätzlich entstandene Substanzfleck entsprach dem von Methoxyhydrochinon. Diese Substanz wird in vivo offensichtlich rasch weiter umgesetzt, denn in zellfreien Extrakten verschieden alter Kulturen war kein Methoxyhydrochinon angesammelt; die Dünnschichtchromatographien zeigten einen neuen, nicht identifizierten Substanzfleck oberhalb der Vanillinsäure (Abb. 38).

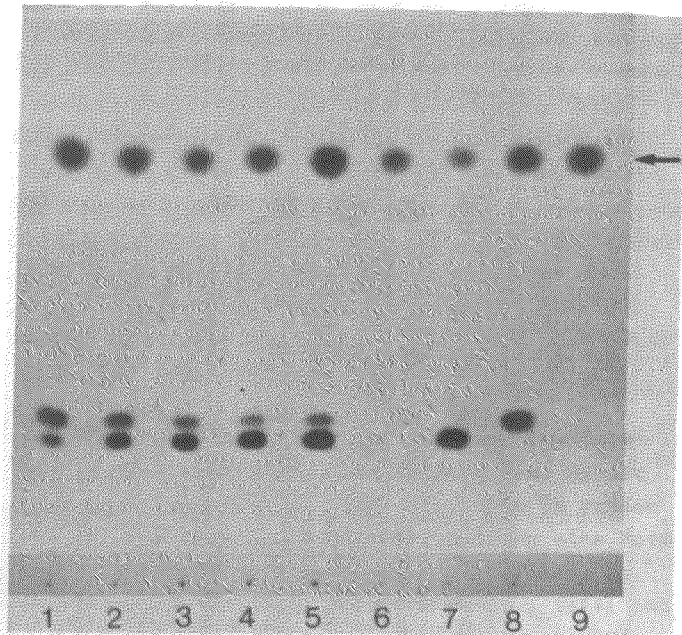


Abb. 37: Dünnschichtchromatographische Trennung der Extrakte von Vanillinsäure Hydroxylase-Bestimmungsansätzen nach 30-minütiger Reaktionsdauer, mit dem Produkt der Ammoniumsulfat-Fällung. 1 - 5: 4.48 - 17.92 mg Protein/Ansatz; 6: Ansatz ohne Vanillinsäure; 7: Methoxyhydrochinon; 8: Vanillinsäure; 9: NADH. Erklärung des durch einen Pfeil gekennzeichneten Substanzflecks s. Abb. 38.

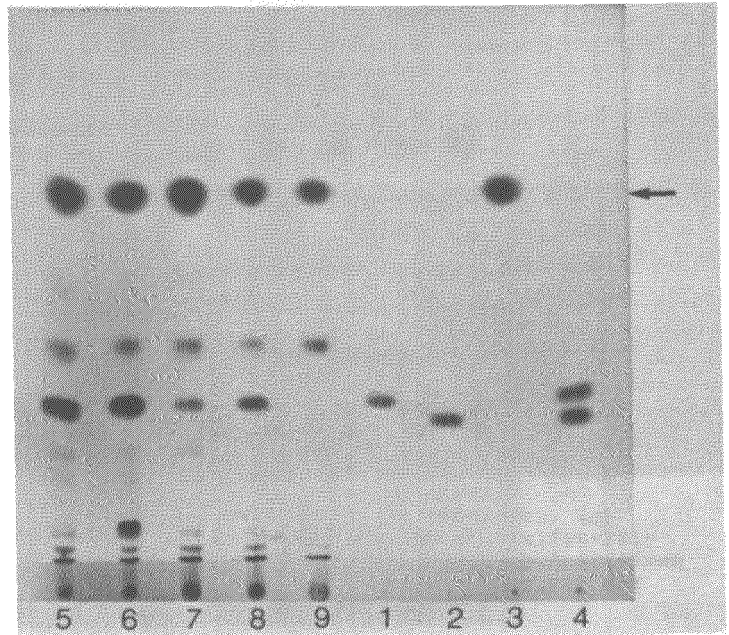


Abb. 38: Dünnschichtchromatographie der aus zellfreien Extrakten extrahierten Aromaten. 5 - 9: Mycelextrakte von 5 - 9 Tage gewachsenen Kulturen; 1: Vanillinsäure; 2: Methoxyhydrochinon; 3: Kontrollextraktion ohne Substanz; 4: Vanillinsäure + Methoxyhydrochinon. Der mit einem Pfeil gekennzeichnete Substanzfleck entstand durch Natriumdithionit, welches bei der Extraktion der Aromaten zugegeben wurde; Proben 1, 2 und 4 wurden ohne $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ extrahiert.

IV. Diskussion=====

Bei einem Screening auf antitumoraktive Substanzen isolierten JANSSEN et al. (1965) einen Stamm von *Polyporus* sp., der ein bis dahin unbekanntes, Methanol-oxidierendes Enzym enthielt. Dieses Enzym wurde teilweise charakterisiert (JANSSEN et al., 1965; JANSSEN und RUELIUS, 1968), und als Alkoholoxidase bezeichnet, da es auch die Oxidation kurzkettiger, primärer Alkohole zu den entsprechenden Aldehyden katalysierte. Bei weiteren Untersuchungen konnte diese Arbeitsgruppe (KERWIN und RUELIUS, 1969) Alkoholoxidase-Aktivitäten in sechs weiteren Basidiomyceten nachweisen. Hierbei wurden die verschiedenen Species auf unterschiedlichen, komplexen Nährmedien kultiviert und *Polyporus obtusus* als bester Alkoholoxidase-Produzent ermittelt.

Während KERWIN und RUELIUS (1969) die höchsten Alkoholoxidase-Aktivitäten in Weißfäulepilzen fanden, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß auch Braunfäulepilze dieses Enzym in großen Mengen produzieren. Ferner enthielten diese Organismen eine Formaldehyd- und eine Formiat Dehydrogenase. Wie bei *Kloeckera* sp. (KATO et al., 1972), *Candida boidinii* (SCHÜTTE et al., 1976) und *Hansenula polymorpha* (VAN DIJKEN, 1976) waren die Formaldehyd Dehydrogenase-Aktivitäten von reduziertem Glutathion abhängig. Alkoholoxidase, Formaldehyd- und Formiat Dehydrogenase konnten erst nach dem Verbrauch der Glukose in den Kulturmedien nachgewiesen werden und scheinen demnach, wie bei Methanol-verwertenden Hefen (SAHM und WAGNER, 1973 a, 1973 b), einer Katabolit-Repression zu unterliegen. Die Alkoholoxidase-Aktivitäten der Mycelien blieben nur kurzzeitig auf ihrem maximalen Wert und nahmen dann rasch wieder ab. Dieser zeitliche Verlauf des Erscheinens von Alkoholoxidase-Aktivitäten in der Form eines relativ scharfen Optimums, der auch von KERWIN und RUELIUS (1969) beobachtet wurde, erschwerte den quantitativen Vergleich von Alkoholoxidase-Aktivitäten verschiedener Pilzstämmen, da die optimalen Zeitpunkte für die Zellernten nicht leicht abzuschätzen waren. Es ist nicht bekannt, ob diese rasche Abnahme der Enzymaktivität auf einer Pro-

teolyse beruht, wie sie für die Hefen *Candida boidinii* (BORMANN und SAHM, 1978) und *Hansenula polymorpha* (VEENHUIS et al., 1978) diskutiert wird, oder ob eine partielle Autolyse der Mycelien für diesen Effekt verantwortlich ist (KERWIN und RUELIUS, 1969). Durch Zellautolyse würde das Enzym in das Kulturmedium entlassen; extrazelluläre Alkoholoxidase-Aktivitäten wurden jedoch weder von KERWIN und RUELIUS (1969), noch in dieser Arbeit gefunden.

Obwohl in diesen Pilzen die Enzyme zur Oxidation des Methanols zu CO_2 vorhanden sind, können sie, im Gegensatz zu den Hefen, nicht auf Methanol wachsen, da ihnen wahrscheinlich die zur Assimilation von C_1 -Verbindungen notwendigen Enzyme fehlen. In Methanol-verwertenden Hefen ist die Schlüsselreaktion für die C_1 -Assimilation die Pentosephosphat-abhängige Fixierung von Formaldehyd (SAHM, 1977; VAN DIJKEN et al., 1978; KATO et al., 1979).

Unter den mycelbildenden, höheren Pilzen ist ein Wachstum auf Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle bisher nur für drei Ascomyceten bekannt (TYE und WILLETTTS, 1973; 1977; SAKAGUCHI et al., 1975). Einer dieser Organismen, *Paecilomyces varioti*, besitzt eine NAD-abhängige Methanol Dehydrogenase (SAKAGUCHI et al., 1975). Auch in methylotrophen Bakterien wird die Oxidation des Methanols durch eine Dehydrogenase katalysiert, die jedoch in vitro nicht von NAD, sondern von Phenazin-methosulfat als primärem Wasserstoffakzeptor und von Ammoniumionen oder Methylamin als Aktivatoren abhängig ist (ANTHONY und ZATMAN, 1964; BAMFORTH und QUAYLE, 1978; WOLF und HANSON, 1978; QUAYLE, 1972). Während die Untersuchungen von SAKAGUCHI et al., (1975) mit *Gliocladium deliquescens* und *Paecilomyces varioti* darauf hinweisen, daß die Assimilation des Methanols in diesen Organismen über den Serin-Weg erfolgt, fanden TYE und WILLETTTS (1973) in *Trichoderma lignorum* eine Pentosephosphat-abhängige Fixierung von C_1 -Verbindungen. Im Gegensatz zu diesen drei Ascomyceten und den methylotrophen Bakterien, haben die Methanol-verwertenden Hefen eine Alkoholoxidase, die als prosthetische Gruppe FAD enthält (SAHM, 1977).

Viele Eigenschaften der gereinigten Alkoholoxidase aus dem Basidiomyceten *Poria contigua* sind denen der Alkoholoxidasen aus Hefen ähnlich (Tab. 18). (a) Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 610 000 und ist aus acht, vermutlich identischen Untereinheiten, mit einem Molekulargewicht von 79 000 aufgebaut. (b) Die Alkoholoxidase aus *Poria contigua* ist ein Flavoprotein; es enthält acht mol FAD/mol Enzym. (c) Das Enzym ist nicht nur für Methanol spezifisch, sondern katalysiert auch die Oxidation kurzkettiger, primärer, aliphatischer Alkohole und von Formaldehyd. Die Oxidation von Formaldehyd durch die Alkoholoxidase beruht auf der starken Hydratisierung des Formaldehyds in wässriger Lösung (BIEBER und TRÜMLER, 1947) zu einem dem Methanol ähnlichen Molekül. Diese Aktivität wurde auch mit den Enzymen aus Hefen gefunden, sie hat jedoch in vivo, wie SAHM (1975) mit einer Mutante der Hefe *Candida boidinii*, die keine Alkoholoxidase enthielt, zeigen konnte, keine Bedeutung bei der Oxidation von Formaldehyd.

Das gereinigte Enzym aus *Poria contigua* unterscheidet sich jedoch von den anderen, in Tabelle 18 aufgeführten Alkoholoxidasen, durch das Absorptionsspektrum des enzymgebundenen Chromophors, dessen Verlauf dem von Ferroflavoproteinen ähnlich ist (KOMAI et al., 1969) und die Anwesenheit eines Metalls im Enzymprotein vermuten läßt (HEMMERICH, pers. Mitteilung). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten aber, daß das Enzym kein Eisen und Zink enthält. Da die Alkoholoxidasen aus zwei weiteren Basidiomyceten, *Lenzites trabeca* und *Polyporus adustus*, sehr ähnliche Absorptionsspektren wie das Enzym aus *Poria contigua* hatten, wäre es interessant zu klären, ob die Alkoholoxidasen aus Basidiomyceten, im Gegensatz zu denen aus Hefen, tatsächlich ein Metall enthalten.

Unterschiedlich ist auch das serologische Verhalten der Alkoholoxidasen aus den Methanol-verwertenden Hefen *Candida boidinii* und *Hansenula polymorpha* und den Basidiomyceten *Poria contigua*, *Lenzites trabeca*, *Polyporus adustus* und *Polyporus obtusus*. Mit dem gegen die gereinigte Alkoholoxidase aus *Poria contigua* gerichteten Antiserum präzipitierte keines der beiden Hefeenzyme, und Anti-

Tab. 18 : Vergleich der Eigenschaften gereinigter Alkoholoxidasen aus Hefen und Basidiomyceten

	Molekulargewicht	Molekulargewicht der Untereinheiten	K _m für CH ₃ OH (mM)	λ _{max} (nm)	Prosthetische Gruppe	Substratspezifität
1. Hefen						
<i>Hansenula polymorpha</i> (VAN DIJKEN, 1976; VAN DIJKEN et al., 1976)	616 000	77 000	1.3	380 395 450	FAD	kurzkettige Alkohole und Formaldehyd
<i>Hansenula polymorpha</i> (KATO et al., 1976)	669 000	83 000	0.23	n.b.	FAD	
<i>Kloeckera</i> sp. (KATO et al., 1976 TANI et al., 1972 a b)	673 000	83 000	0.44	373 392 461	FAD	
<i>Candida boidinii</i> (SAHM und WAGNER, 1973)	600 000	74 000	2.0	372 460	FAD	
2. Basidiomyceten						
<i>Polyporus</i> sp. (JANSSEN und RUELIUS, 1968; JANSSEN et al., 1965)	>300 000	85 000	1.52	n.b.	FAD	
<i>Poria contigua</i>	610 000	79 000	0.2	330 380 455	FAD	

körper gegen das gereinigte Enzym aus *Candida boidinii* ergaben keine Immunreaktion mit den Alkoholoxidasen aus den Basidiomyceten. Die Alkoholoxidasen der Braunfäulepilze *Poria contigua* und *Lenzites trabea* verhielten sich immunologisch identisch, während die der Weißfäulepilze serologisch partiell identisch (*Polyporus adustus*), bzw. gar nicht (*Polyporus obtusus*) mit dem Antiserum gegen das *Poria*-Enzym reagierten. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, denn die Braun- und Weißfäulepilze gehören nicht taxonomisch unterschiedlichen Gruppen der Basidiomyceten an, sondern sind nahe verwandt und können sogar derselben Gattung angehören; außerdem gibt es Beispiele für Übergangsformen zwischen diesen beiden physiologischen Gruppen (HAIDER und TROJANOWSKI, 1978). Die serologische Ungleichheit der Alkoholoxidasen aus Hefen und Basidiomyceten ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Aminosäure-Zusammensetzung der Enzyme zurückzuführen; dagegen scheint der Aufbau aus acht Untereinheiten gleichen Molekulargewichts zu einem hochmolekularen Enzym, eine gemeinsame Eigenschaft aller bisher isolierten Alkoholoxidasen zu sein (Tab. 18, Abb. 32).

Parallel zu der Alkoholoxidase bildet *Poria contigua* das Enzym Katalase. Wie eine Reihe von Untersuchungen gezeigt haben, sind diese beiden Enzyme in den Methanol-verwertenden Hefen in Microbodies lokalisiert (SAHM et al., 1975; ROGGENKAMP et al., 1975; VAN DIJKEN et al., 1975; FUKUI et al., 1975; VEENHUIS et al., 1976). Die Zellen von *Poria contigua* enthalten ebenfalls Microbodies, in denen die Katalase nach einer cytochemischen Anfärbung mit Diaminobenzidin (DAB) (NOVIKOFF und GOLDFISCHER, 1969) elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Wenn DAB-Aktivitätsanfärbungen nicht mit dem Katalase-Substrat H_2O_2 , sondern mit Methanol durchgeführt wurden, bildete sich in den Microbodies ebenfalls das elektronendichte DAB-Reaktionsprodukt; das durch die Alkoholoxidase-Reaktion freigesetzte H_2O_2 diente also der Katalase zur peroxidativen Umsetzung des Diaminobenzidins. Diese Experimente beweisen jedoch noch nicht eindeutig, daß auch die Alkoholoxidase sich innerhalb dieser Organellen befindet,

denn sie schließen die Möglichkeit nicht aus, daß die Methanol-Oxidation außerhalb der Microbodies stattfindet, und das gebildete Wasserstoffperoxid in sie eindiffundiert. Analog zu der Situation in tierischen, pflanzlichen (MASTERS und HOLMES, 1977) und in Microbodies von Methanol-verwertenden Hefen (SAHM, 1977) ist es aber wahrscheinlich, daß beide Enzyme, Alkoholoxidase und Katalase, in den Microbodies von *Poria contigua* lokalisiert sind. Kristalloide Strukturen, wie in den Microbodies von *Candida boidinii* (SAHM et al., 1975) und *Hansenula polymorpha* (VEENHUIS et al., 1976) waren hier allerdings nicht zu erkennen.

Da die Alkoholoxidase 4 - 5% des Gesamtproteins von Mycelien der Braunfäulepilze *Poria contigua* und *Lenzites trabea* ausmacht, stellt sich die Frage nach der Funktion des Enzyms im Stoffwechsel dieser holzzersetzenden Organismen. Zwei Bestandteile des Holzes können als potentielle Quellen für Methanol gelten: die Methoxylgruppen des Lignins und die Methylester des Pektins. Bei einigen *Monilinia* species, die die Braunfäule von Steinfrüchten verursachen, wurden pektinolytische Enzyme nachgewiesen (WILLETTS et al., 1977). Da *Poria contigua* kein Wachstum auf Pektin zeigte, und Pektinmethylesterase-Aktivität weder in Kulturfiltraten, noch in Mycelextrakten nachgewiesen werden konnte, ist das Lignin der wahrscheinliche Donator des Substrats der Alkoholoxidase.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum enzymatischen Angriff auf die methoxylierte Lignin-Modells substanz Vanillinsäure (3-Methoxy-4-Hydroxybenzoesäure) durch *Poria contigua* zeigten, daß diese Substanz in den Zellen zunächst zu einem wahrscheinlich ebenfalls aromatischen Produkt umgewandelt wird. Da diese Ergebnisse qualitativer Art sind, erlauben sie keine Aussage darüber, ob diese unidentifizierte Verbindung in einer langsameren, enzymatischen Folgereaktion weiter metabolisiert wird. Zellfreie Extrakte von *Poria contigua* enthalten ein Enzym, welches die oxidative Decarboxylierung von Vanillinsäure zu Methoxyhydrochinon katalysiert, eine Reaktion, die auch für *Polyporus dichrous* (KIRK und LORENZ, 1973) und *Sporotrichum pulveru-*

lentum (BUSWELL et al., 1979; YAJIMA et al., 1979) kürzlich beschrieben wurde. Methoxyhydrochinon wird offensichtlich in den Zellen von *Poria contigua* rasch weiter umgesetzt, denn es war in Extrakten von verschiedenen alten, auf Vanillinsäure-haltigen Medien kultivierten Mycelien nicht nachweisbar. Die Frage, ob Braunfäulepilze neben der Demethylierung auch die Ringe aromatischer Lignin-Modellsubstanzen spalten (KIRK, 1975 a), kann hier nicht beantwortet werden; die oxidative Decarboxylierungsreaktion weist aber darauf hin, daß in diesem Braunfäulepilz ein ähnlicher Abbauweg existiert, wie er für den Weißfäulepilz *Sporotrichum pulverulentum* (BUSWELL und ERIKSSON, 1979; ERIKSSON, 1979) vorgeschlagen wurde.

Obwohl die Frage nach der Art der Demethylierung noch offenbleibt, gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dieser Reaktion und dem Auftreten von Alkoholoxidase-Aktivitäten. (a) In Abwesenheit einer Kohlenstoffquelle wie Glukose oder Cellobiose, hatte Vanillinsäure einen deutlich steigernden Einfluß auf die Alkoholoxidase-Aktivitäten der Kulturen. (b) Die Bildung der Alkoholoxidase ist in Gegenwart von Glukose reprimiert; HAIDER und TROJANOWSKI (1978) beobachteten eine Hinderung der Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$, besonders aus den Methoxylgruppen von DHP-Lignin, durch die Anwesenheit von Glukose, Cellobiose, oder Xylose. Die Autoren diskutierten eine Katabolit-Repression von Enzymen des Ligninabbaus durch diese Zucker, oder deren intermediäre Abbauprodukte. (c) Mit einer Gruppe der von HAIDER und TROJANOWSKI (1978) bearbeiteten Pilze wurde gezeigt, daß die Stämme, die am besten die Methoxylgruppen aus DHP-Lignin abspalten, auch die höchsten Alkoholoxidase-Aktivitäten aufwiesen.

Bei Verwendung von methoxylierten Benzoesäure-Derivaten als Lignin-Modellsubstanzen muß in Betracht gezogen werden, daß diese, im Gegensatz zu dem wasserunlöslichen, polymeren Lignin, in die Zelle aufgenommen werden können. Für den Abbau des intakten Lignocellulose-Polymers müssen also extrazelluläre, oder an der Zellwand lokalisierte Enzyme postuliert werden (CRAWFORD und

CRAWFORD, 1980). Bei Organismen, die als Ligninzerersetzer bekannt sind, kann jedoch angenommen werden, daß die Abbaureaktionen für monomere Ligninbestandteile und für Lignin miteinander korreliert sind. Das Arbeiten mit monomeren Verbindungen zum Verständnis enzymatischer Mechanismen, um darauf aufbauend komplexere Ligninmodelle und schließlich Lignin als Substrate einzusetzen ist, trotz der erwähnten Einschränkung, ein allgemein akzeptiertes Vorgehen (ERIKSSON, 1979; CRAWFORD und CRAWFORD, 1980).

Es ist bisher noch unklar, wie Enzyme von Braunfäulepilzen nach außen abgegeben werden. Da auch bei wachsenden Kulturen höherer Pilze Autolyseprozesse eine Rolle spielen (RIEMAY und TRÜGER, 1978 a, 1978 b), und bei holzzersetzenden Basidiomyceten zur Wiedergewinnung von Stickstoff auf extrem stickstoffarmen Standorten, wie Holz, solche Vorgänge diskutiert wurden (COWLING und MERRILL, 1966), ist es denkbar, daß bei Braunfäulepilzen die Zellautolyse eines Teils der Kulturen auch der Mechanismus zur Ausscheidung von Enzymen ist (ANDER und ERIKSSON, 1978).

V. Zusammenfassung

Über das Vorkommen und die Bedeutung C₁-oxidierender Enzyme in holzzersetzenden höheren Pilzen ist, im Gegensatz zu den Methanol-verwertenden Hefen, noch wenig bekannt. Da bei dem mikrobiellen Abbau von Lignin sehr wahrscheinlich reduzierte C₁-Verbindungen freigesetzt werden, stellte sich die Frage, ob in holzzersetzenden Basidiomyceten C₁-oxidierende Enzyme existieren und in einem Zusammenhang mit dem Abbau von monomeren Lignin-Modellsubstanzen stehen.

1. In zellfreien Extrakten mehrerer, submers kultivierter Braun- und Weißfäulepilze wurden Alkoholoxidase (EC 1.1.3.13), Formaldehyd Dehydrogenase (EC 1.2.1.1) und Formiat Dehydrogenase (EC 1.2.1.2) nachgewiesen. Keiner der untersuchten Stämme konnte jedoch auf Methanol wachsen.

2. Die Alkoholoxidase aus dem Braunfäulepilz *Poria contigua*, in welchem dieses Enzym bis zu 4.5% des Gesamtproteins zellfreier Extrakte ausmachte, wurde gereinigt. Das Enzym hatte ein Molekulargewicht von $610\,000 \pm 5000$ und enthielt acht mol FAD/mol als prosthetische Gruppe. Aus dem Molekulargewicht der Untereinheiten (79 000) und elektronenmikroskopischen Analysen ließ sich folgern, daß das Enzym aus acht, wahrscheinlich identischen Untereinheiten aufgebaut ist.

3. Die Alkoholoxidase aus *Poria contigua* war nicht spezifisch für Methanol, sondern oxidierte auch kurzkettige, primäre Alkohole (C₁ - C₄) und Formaldehyd. Der apparente K_m-Wert für Methanol war 0.2 mM, und der für Formaldehyd 6.1 mM. Natriumazid inhibierte das Enzym kompetitiv mit Methanol.

4. Zwischen den Alkoholoxidasen aus zwei Methanol-verwertenden Hefen und den Alkoholoxidasen aus vier Basidiomyceten erfolgte keine immunologische Kreuzreaktion. Die Absorptionsspektren der Alkoholoxidasen aus *Poria contigua* und aus zwei anderen Basidio-

myceten waren deutlich unterschiedlich von denen der Alkoholoxidasen aus Methanol-verwertenden Hefen.

5. Wie durch elektronenmikroskopische Untersuchungen in Verbindung mit einer cytochemischen Färbetechnik gezeigt werden konnte, ist Katalase (EC 1.11.1.6), und sehr wahrscheinlich auch die Alkoholoxidase in den Zellen von *Poria contigua* in Microbodies lokalisiert.

6. Während die Alkoholoxidase durch Glukose reprimiert wurde, wirkte die Lignin-Modellsubstanz Vanillinsäure (3-Methoxy-4-Hydroxybenzoesäure) steigernd auf die Alkoholoxidase-Aktivität in *Poria contigua*. Mit einer Gruppe holzzersetzender Basidiomyceten konnte eine Parallelität von Demethylierungs-Aktivitäten aus DHP-Lignin und dem Auftreten der Alkoholoxidase festgestellt werden. Wie enzymatische Untersuchungen zeigten, wird der Abbau von Vanillinsäure in *Poria contigua* durch eine oxidative Decarboxylierung zu Methoxyhydrochinon initiiert.

VI. Literaturverzeichnis=====

- AEBI, H. (1974): Katalase. In: Methoden der Enzymatischen Analyse, Eds. BERGMAYER, H.U. und GAWEHN, K., I, 713-724
- ANDER, P. und ERIKSSON, K.-E. (1978): Lignig Degradation and Utilization by Micro-organisms. In: Progress In Industrial Microbiology, 14, 1-59
- ANTHONY, C. und ZATMAN, L.J. (1964): The Microbial Oxidation Of Methanol. 2. The Methanol-Oxidizing Enzyme Of *Pseudomonas* SP. M 27. Biochem. J., 92, 614-621
- BAMFORTH, C.W. und QUAYLE, J.R. (1978): The Dye-Linked Alcohol Dehydrogenase of *Rhodopseudomonas acidophila*. Biochem. J., 169, 677-686
- BAVENDAMM, W. (1928): Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxidasen bei holzzerstörenden Pilzen. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 38, 257-276
- BERNHARDT, F.-H., PACHOWSKI, H. und STAUDINGER, H. (1975): A 4-Methoxybenzoate O-Demethylase from *Pseudomonas putida*. Eur. J. Biochem., 57, 241-256
- BIEBER, R. und TRÜMLER, G. (1947): Angenäherte spektrographische Bestimmung der Hydratationsgleichgewichtskonstanten wässriger Formaldehydlösungen. Helv. chim. Acta 30, 1860-1865.
- BORMANN, C. und SAHM, H. (1978): Degradation of Microbodies in Relation to Activities of Alcohol Oxidase and Catalase in *Candida boidinii*. Arch. Microbiol., 117, 67-72
- BUSWELL, J.A. und MAHMOOD, A. (1972): Bacterial Degradation of p-Methoxybenzoic Acid. Arch. Microbiol., 84, 275-286
- BUSWELL, J.A., ANDER, P., PETERSSON, B. und ERIKSSON, K.-E. (1979): Oxidative Decarboxylation Of Vanillic Acid By *Sporotrichum pulverulentum*. FEBS Letters, 103, 98-101
- BUSWELL, J.A. und ERIKSSON, K.-E. (1979): Aromatic Ring Cleavage By The White-Rot Fungus *Sporotrichum pulverulentum*. FEBS Letters, 104, 258-260
- CARTWRIGHT, N.J. und BUSWELL, J.A. (1967): The Separation of Vanillate O-Demethylase from Protocatechuate 3,4-Oxygenase by Ultracentrifugation. Biochem. J., 105, 767-770
- CARTWRIGHT, N.J. und SMITH, A.R.W. (1967): Bacterial Attack on Phenolic Ethers. Biochem. J., 102, 826-841

- CARTWRIGHT, N.J. und BUSWELL, J.A. (1969): Bacterial attack on phenolic ethers. Degradation of 4-methoxybenzoate by cell-free extracts of a *Pseudomonad*. *Microbios*, 1A, 31-36
- COLBY, J., DALTON, H. und WHITTENBURY, R. (1979): Biological And Biochemical Aspects Of Microbial Growth On C₁ Compounds. *Ann. Rev. Microbiol.*, 33, 481-517
- COWLING, E.B. und MERRILL, W. (1966): Distribution and reuse of nitrogen in wood-destroying fungi. In: BECKER, G. LIESE, W. (Hrsg.), *Holz und Organismen*, 269-274
- CRAWFORD, R.L. und PERKINS OLSON, P. (1978): Microbial Catabolism of Vanillate: Decarboxylation to Guaiacol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 539-543
- CRAWFORD, D.L. und CRAWFORD, R.L. (1980): Microbial degradation of lignin. In: *Enzyme Microb. Technol.*, 2, 11-22
- DAVIDSON, R.W., CAMPBELL, W.A. und BLAISDELL, D.J. (1938): Differentiation Of Wood-Decaying Fungi By Their Reactions On Gallic Or Tannic Acid Medium. *J. Agric. Res.*, 57, 683-695
- DAWES, E.A. (1972): *Quantitative Problems In Biochemistry*. Churchill Livingstone, 5. Aufl.
- DE DUVE, C. und BAUDHUIN, P. (1966): Peroxisomes (Microbodies and Related Particles). In: *Physiol. Rev.*, 46, 323-357
- DE DUVE, C. (1969): The peroxisome: a new cytoplasmic organelle. *Proc. Roy. Soc. B.*, 173, 71-83
- DIXON, M. (1953): The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochem. J.*, 55, 170-171
- DOEG, K.A. und ZIEGLER, D.M. (1962): Simplified Methods for the Estimation of Iron in Mitochondria and Submitochondrial Fractions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 97, 37-40
- ELLMAN, G.L. (1959): Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70-77
- ERIKSSON, K.-E. (1979): Degradation of lignocellulosic materials by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. In: *Proceedings of the COST-Workshop on the Production and Feeding of Single Cell Protein*. Kernforschungsanlage Jülich GmbH, (1980) 48-63
- FAIRBANKS, G., STECK, T.L. und WALLACH, D.F.H. (1971): Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane. *Biochemistry*, 10, 2606-2616

- FRISELL, W.R. und MACKENZIE, C.G. (1958): The Determination of Formaldehyde And Serine in Biological Systems. In: Methode Of Biochemical Analysis, Ed. GLICK, D., VI, 63-77
- FUJII, T. und TONOMURA, K. (1972): Oxidation of Methanol, Form-aldehyde and Formate by a *Candida* Species. Agr. Biol. Chem., 36, 2297-2306
- FUKUI, S., KAWAMOTO, S., YASUHARA, S., TANAKA, A. OSUMI, M. und IMAIZUMI, F. (1975): Microbody of Methanol-Grown Yeasts. Localization of Catalase and Flavin-Dependent Alcohol Oxidase in the Isolated Microbody. Eur. J. Biochem., 59, 561-566
- FUKUZUMI, T., URAUSHIHARA, S., OOHASHI, T. und SHIBAMOTO, T. (1964): Enzymatic Degradation of Lignin. III. Oxidation Accompanying Carbon Dioxide Liberation of Vanillic Acid, Vanilloylformic Acid and Guaiacacypyrvic Acid by Enzyme of *Polystictus sanguineus* and *Poria subacida*. J. Jap. Wood Res. Soc., 10 242-250
- FUKUZUMI, T., TAKATUKA, H. und MINAMI, K. (1969): Enzymic Degradation of Lignin. V. The Effect of NADH on the Enzymic Cleavage of Arylalkylether Bond in Veratrylglycerol- β -guaiacyl ether as Lignin Model Compound. Arch. Biochem. Biophys., 129, 396-403
- GOLDTHWAITE, J.J. und BOGORAD, L. (1971): A One-Step Method for the Isolation and Determination of Leaf Ribulose-1,5-diphosphate Carboxylase. Analyt. Biochem., 41, 57-66
- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J. und DAVID, M.M. (1949): Determination Of Serum Proteins By Means Of The Biuret Reaction. J. Biol. Chem., 177, 751-766
- HABEEB, G.L. (1972): Reaction of Protein Sulfhydryl Groups with Ellman's Reagent. In: Methods in Enzymology. Eds. HIRS, C.H.W. und TIMASHEFF, S.N., XXV Part B, 457-464
- HAIDER, K. und TROJANOWSKI, J. (1975): Decomposition of Specifically ^{14}C -Labelled Phenols and Dehydropolymers of Coniferyl Alcohol as Models for Lignin Degradation by Soft and White Rot Fungi. Arch. Microbiol., 105, 33-41
- HAIDER, K. und TROJANOWSKI, J. (1978): A Comparison Of The Degradation Of ^{14}C -Labelled DHP And Corn Stalk Lignins By Micro- And Macrofungi And By Bacteria. In: Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry And Applications (Abstracts). Products Laboratory, Madison, Wisc., USA
- HEIM, W.G., APPLEMAN, D. und PYFROM, H.T. (1956): Effects of 3-Amino-1,2,4-Triazole (AT) on Catalase and Other Compounds. Amer. J. Physiol., 186, 19-23

- HENDERSON, M.E.K. (1957): Metabolism of Methoxylated Aromatic Compounds by Soil Fungi. J. gen. Microbiol., 16, 686-695
- HIGUCHI, T. (1971): Formation And Biological Degradation Of Lignins. In: Adv. In Enzymology, 34, 207-283
- ISHIHARA, T. und MIYAZAKI, M. (1974): Demethylation of Lignin and Lignin Models by Fungal Laccase. J. Jap. Wood Res. Soc., 20, 39-41
- ISHIHARA, T. und ISHIHARA, M. (1975): Estimation of Orthoquinone Structure and Methanol Formed from Lignin Models by Fungal Laccase. J. Jap. Wood Res. Soc., 21, 323-325
- ISHIHARA, T. und ISHIHARA, M. (1976): Oxidation of Syringic Acid by Fungal Laccase. J. Jap. Wood Res. Soc., 22, 371-375
- JANSSEN, F.W., KERWIN, R.M. und RUELIUS, H.W. (1965): Alcohol Oxidase, A Novel Enzyme From A Basidiomycete. Biochem. Biophys. Res. Commun., 20, 630-634
- JANSSEN, F.W. und RUELIUS, H.W. (1968): Alcohol Oxidase, A Flavoprotein From Several Basidiomycetes Species. Biochem. Biophys. Acta, 151, 330-342
- KATO, N., TOMAOKI, T., TANI, Y. und OGATA, K. (1972): Purification and Characterization of Formaldehyde Dehydrogenase in a Methanol-utilizing Yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. Agr. Biol. Chem., 36, 2411-2419
- KATO, N., KANO, M., TANI, Y. und OGATA, K. (1974): Purification and Characterization of Formate Dehydrogenase in a Methanol utilizing Yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. Agr. Biol. Chem., 38, 111-116
- KATO, N., OMORI, Y., TANI, Y. und OGATA, K. (1976): Alcohol Oxidases of *Kloeckera* sp. and *Hansenula polymorpha*. Eur. J. Biochem., 64, 341-350
- KATO, N., NISHIZAWA, T., SAKAZAWA, C., TANI, Y. und YAMADA, H. (1979): Xylulose 5-phosphate-dependent Fixation of Formaldehyde in a Methanol-utilizing Yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. Agric. Biol. Chem., 43, 2013-2015
- KERWIN, R.M. und RUELIUS, H.W. (1969): Production of Alcohol Oxidase by Several Basidiomycetes. Appl. Microbiol., 17, 347-351
- KIRK, T.K., ADLER, E. (1970): Methoxyl-deficient Structural Elements in Lignin of Sweetgum Decayed by a Brown-rot Fungus. Acta. Chem. Scand., 24, 3379-3390

- KIRK, T.K. (1971): Effects Of Microorganisms On Lignin. In: Ann. Rev. Phytopathology, 9, 185-210
- KIRK, T.K. und LORENZ, L.F. (1973): Methoxyhydroquinone, an Intermediate of Vanillate Catabolism by *Polyporus dichrous*. Appl. Microbiol., 26, 173-175
- KIRK, T.K. und CHANG, H.-m. (1974): Decomposition of Lignin by White-rot Fungi. I. Isolation of Heavily Degraded Lignins from Decayed Spruce. Holzforschung, 28, 217-222
- KIRK, T.K. und CHANG, H.-m. (1975): Decomposition of Lignin by White-rot Fungi. II. Characterization of Heavily Degraded Lignins from Decayed Spruce. Holzforschung, 29, 56-64
- KIRK, T.K., CONNORS, W.J., BLEAM, R.D., HACKETT, W.F. und ZEIKUS, J.G. (1975): Preparation and microbial decomposition of synthetic (^{14}C) lignins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 2515-2519
- KIRK, T.K. (1975 a): Chemistry of Lignin Degradation by Wood-Destroying Fungi. In: Biological Transformation of Wood by Microorganisms. Ed. LIESE, W., Springer Verlag
- KIRK, T.K. (1975 b): Effects of a Brown-rot Fungus, *Lenzites trabea*, on Lignin in Spruce Wood. Holzforschung, 29, 99-107
- KIRK, T.K., CONNORS, W.J. und ZEIKUS, J.G. (1977): Advances In Understanding The Microbiological Degradation Of Lignin. In: Recent Adv. Phytochem., 11, 369-394
- KOMAI, H., MASSEY, V. und PALMER, G. (1969): The Preparation and Properties of DeFlavo Xanthine Oxidase. J. Biol. Chem., 244, 1692-1700
- LEE, Y.-L.T., SPARNINGS, V.L. und DAGLEY, S. (1978): Catabolism of 2,4,5-Trimethoxybenzoic Acid and 3-Methoxycrotonic Acid. Appl. Environ. Microbiol., 35, 817-819
- LINEWEAVER, H. und BURK, D. (1934): The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J. Am. Chem. Soc., 56, 658-666
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J. (1951): Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275
- MARGOLIASH, E., NOVOGRODSKY, A. und SCHEJTER, A. (1960): Irreversible Reaction of 3-Amino-1,2,4-triazole and related Inhibitors with the Protein of Catalase. Biochem. J., 74, 339-348

- MASSEY, V. und CURTI, B. (1966): A New Method of Preparation of D-Amino Acid Oxidase Apoprotein and a Conformational Change after Its Combination with Flavin Adenine Dinucleotide. J. Biol. Chem., 241, 3417-3423
- MASTERS, C. und HOLMES, R. (1977): Peroxisomes: New Aspects of Cell Physiology and Biochemistry. Physiological Reviews, 57, 816-882
- MAURER, H.R. (1971): Disc Electrophoresis, 2. Aufl., S.44, de Gruyter, Berlin, New York
- MAXWELL, D.P., MAXWELL, M.D., HÄNSSLER, G., ARMENTROUT, V.N., MURRAY, G.M. und HOCH, H.C. (1975): Microbodies and Glyoxylate-cycle Enzyme Activities in Filamentous Fungi. Planta, 124, 109-123
- MAXWELL, D.P., ARMENTROUT, V.N. und GRAVES, L.B. (1977): Microbodies In Plant Pathogenic Fungi. Ann. Rev. Phytopathol., 15, 119-134
- METZ, B. und KOSSEN, N.W.F. (1977): The Growth of Molds in the Form of Pellets - A Literature Review. Biotechnology and Bioengineering, XIX, 781-799
- MINAMI, K., TSUCHIYA, M. und FUKUZUMI, T. (1965): Metabolic Products from Aromatic Compounds by the Wood-rotting Fungus *Polystictus sanguineus*. IV. Culturing Condition for Reduction and Demethoxylation of Veratric Acid. J. Jap. Wood Res. Soc., 11, 179-183
- MÜLLER, E. und LOEFFLER, W. (1971): Mykologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- NASH, T. (1953): The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction. Biochemistry, 55, 416-421
- NEVILLE, D.M. (1971): Molecular Weight Determination of Protein-Dodecyl Sulfate Complexes by Gel Electrophoresis in a Discontinuous Buffer System. J. Biol. Chem., 246, 6328-6334
- NOVIKOFF, A.B. und GOLDFISCHER, S. (1969): Visualization Of Peroxisomes (Microbodies) And Mitochondria With Diaminobenzidine. J. Histochem. Cytochem., 17, 675-680
- OUCHTERLONY, Ö. (1958): Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progress in Allergy V, 1-78
- PASZCZYŃSKI, A. und TROJANOWSKI, J. (1977): An affinity-column procedure for the purification of veratrate O-demethylase from fungi. Microbios, 18, 111-121
- PAZUR, J.H. und KLEPPE, K. (1964): The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. Biochemistry, 3, 578-583

- QUAYLE, J.R. (1972): The Metabolism of One-Carbon Compounds by Micro-Organisms. In: Advances in Microbial Physiology, 7, 119-203
- REUSS, M., SAHM, H. und WAGNER, F. (1974): Mikrobielle Protein-Gewinnung auf Methanol-Basis. Chem.-Ing.-Tech., 46, 669-676
- RIBBONS, D.W. (1970): Stoichiometry Of O-Demethylase Activity In *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Letters, 8, 101-104
- RIEMAY, K.-H. und TRÜGER, R. (1978 a): Autolyse bei Pilzen. I. Autolyse bei *Coprinus* und in Pilzkulturen. Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 18, 523-540
- RIEMAY, K.-H. und TRÜGER, R. (1978 b): Autolyse bei Pilzen. II. Autolytischer Abbau von Kohlenhydraten, Proteinen und Nucleinsäuren. Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 18, 617-625
- ROGGENKAMP, R., SAHM, H. und WAGNER, F. (1974): Microbial Assimilation Of Methanol. Induction And Function Of Catalase In *Candida boidinii*. FEBS Letters, 41, 283-286
- ROGGENKAMP, R., SAHM, H., HINKELMANN, W. und WAGNER, F. (1975): Alcohol Oxidase and Catalase in Peroxisomes of Methanol-Grown *Candida boidinii*. Eur. J. Biochem., 59, 231-236
- SAHM, H. und WAGNER, F. (1972): Mikrobielle Verwertung von Methanol. Isolierung und Charakterisierung der Hefe *Candida boidinii*. Arch. Mikrobiol., 84, 29-42
- SAHM, H. und WAGNER, F. (1973 a): Microbial Assimilation of Methanol. The Ethanol- and Methanol-Oxidizing Enzymes of the Yeast *Candida boidinii*. Eur. J. Biochem., 36, 250-256
- SAHM, H. und WAGNER, F. (1973 b): Mikrobielle Verwertung von Methanol. Eigenschaften der Formaldehyddehydrogenase und der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*. Arch. Mikrobiol., 90, 263-268
- SAHM, H., ROGGENKAMP, R., WAGNER, F. und HINKELMANN, W. (1975): Microbodies in Methanol-Grown *Candida boidinii*. J. Gen. Microbiol., 88, 218-222
- SAHM, H. (1975): Oxidation of Formaldehyde by Alcohol Oxidase of *Candida boidinii*. Arch. Mikrobiol., 105, 179-181
- SAHM, H. (1977): Metabolism of Methanol by Yeasts. In: Advances in Biochemical Engineering, 6, 77-103

- SAKAGUCHI, K., KURANE, R. und MURATA, M. (1975): Assimilation of Formaldehyde and Other C₁-Compounds by *Gliocladium deliquescens* and *Faecilomyces variotti*. In: Microbial Growth On C₁-Compounds. Int. Symposium, Tokyo, 1974; Proceedings S. 163-177
- SCHERER, P. (1978): Isolierung und Charakterisierung der CO₂-Reduktase aus *Clostridium pasteurianum*, ein neues Eisen-Schwefel Molybdoprotein. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- SCHÜTTE, H., FLOSSDORF, J., SAHM, H. und KULA, M.-R. (1976): Purification and Properties of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii*. Eur. J. Biochem., 62, 151-160
- SKYRING, G.W., MILLER, R.W. und PURKAYASTHA, V. (1970): Improved Method for Characterization of Bacterial Dehydrogenases Using Acrylamide Gel Disc Electrophoresis. Analyt. Biochem., 36, 511-520
- SPARNINGS, V.L. und DAGLEY, S. (1975): Alternative Routes of Aromatic Catabolism in *Pseudomonas acidovorans* and *Pseudomonas putida*: Gallic Acid as a Substrate and Inhibitor of Dioxygenases. J. Bacteriol., 124, 1374-1381
- SPURR, R.A. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrast. Res., 26, 31-46
- STANIER, R.Y. und ORNSTON, L.N. (1973): The β -ketoadipate pathway. In: Advances in Microbial Physiology, 9, 89-151
- SUNDMAN, V. und NÄSE, L. (1971): A Simple Plate Test for Direct Visualisation of Biological Lignin Degradation. Paperi ja Puu, 2, 67-71
- SVENBERG, T. und PEDERSEN, K.O. (1959): The Ultracentrifuge. Clarendon Press, Oxford, S. 48
- TANI, Y., MIYA T., NISHIKAWA, H. und OGATA, K. (1972 a): The Microbial Metabolism of Methanol. Part I, Formation and Crystallization of Methanol-oxidizing Enzyme in a Methanol-utilizing Yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. Agr. Biol. Chem., 36, 68-75
- TANI, Y., MIYA, T. und OGATA, K. (1972 b): The Microbial Metabolism of Methanol. Part II. Properties of Crystalline Alcohol Oxidase from *Kloeckera* sp. No. 2201. Agr. Biol. Chem., 36, 76-83
- TANI, Y., KATO, N. und YAMADA, H. (1978): Utilization of Methanol by Yeasts. Adv. Appl. Microbiol., 24, 165-186

- TOLBERT, N.E. (1971): Microbodies-Peroxisomes And Glyoxysomes. In: Annual Rev. Plant Physiol., 22, 45-74
- TROJANOWSKI, J., LEONOWICZ, A. und HAMPEL, B. (1966): Exoenzymes in Fungi Degrading Lignin. II. Demethoxylation of lignin and vanillic acid. Acta Microbiologica Polonica, 15, 17-22
- TYE, R.J. und WILLETTS, A.J. (1977): Fungal Growth on C₁-Compounds. Appl. Environ. Microbiol., 33, 758-761
- TYE, R.J. und WILLETTS, A.J. (1973): Fungal growth on methanol. J. Gen. Microbiol., 77, 1
- VAN DIJKEN, J.P., VEENHUIS, M., VERMEULEN, C.A. und HARDER, W. (1975): Cytochemical Localization of Catalase Activity in Methanol-Grown *Hansenula polymorpha*. Arch. Microbiol., 105, 261-267
- VAN DIJKEN, J.P. (1976): Oxidation of methanol by yeasts. Dissertation, Universität Groningen, Holland
- VAN DIJKEN, J.P., OTTO, R. und HARDER, W. (1976): Growth of *Hansenula polymorpha* in a Methanol-Limited Chemostat. Arch. Microbiol., 111, 137-144
- VAN DIJKEN, J.P., HARDER, W., BEARDSMORE, A.J. und QUAYLE, J.R. (1978): Dihydroxyacetone: An Intermediate In The Assimilation Of Methanol By Yeasts? FEMS Microbiology Letters, 4, 97-102
- VEENHUIS, M., VAN DIJKEN, J.P. und HARDER, W. (1976): Cytochemical Studies on the Localization of Methanol Oxidase and Other Oxidases in Peroxisomes of Methanol-Grown *Hansenula polymorpha*. Arch. Microbiol., 111, 123-135
- VEENHUIS, M., ZWART, K. und HARDER, W. (1978): Degradation of Peroxisomes After Transfer Of Methanol-Grown *Hansenula polymorpha* Into Glucose-Containing Media. FEMS Microbiology Letters, 3, 21-28
- VENABLE, J.H. und COGGESHALL, R. (1965): A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J. Cell Biol., 25, 407-408
- WAHLEFELD, A.W. (1971): A New Chromogen For The Enzymatic Blood Glucose Determination With GOD/POD. Quad. Sclavo Diagn., 7, 232-242
- WEBER, K. und OSBORN, M. (1969): The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem., 244, 4406-4412

- WHITBY, L.G., (1953): A New Method for Preparing Flavin-adenine Dinucleotide. *Biochem. J.*, 54, 437-442
- WILLETTS, H.J., BYRDE, R.J.W. und FIELDING, A.H. (1977): The Taxonomy of the Brown Rot Fungi (*Monilia* spp.) Related to their Extracellular Cell Wall-degrading Enzymes. *J. Gen. Microbiol.*, 103, 77-83
- WOLF, H.J. und HANSON, R.S. (1978): Alcohol Dehydrogenase from *Methylobacterium organophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 105-114
- WORGAN, J.T. (1968): Culture Of The Higher Fungi. In: *Progress in Industrial Microbiology*, 3, 73-139
- YAJIMA, Y., ENOKI, A., MAYFIELD, M.B. und GOLD, M.H. (1979): Vanillate Hydroxylase from the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.*, 123, 319-321

Lebenslauf

23.9.1950	geboren in Köln
1957 bis 1961	Besuch der Grundschule in Köln
1961 bis 1969	Besuch des Gymnasiums in Köln und Abitur
1.9.1969 bis 19.12.1970	Programmiererin bei der Firma Nixdorf Computer AG in Paderborn und in London
14.4.1971	Beginn des Studiums der Biologie an der Universität zu Köln
Oktober 1973	Diplom-Biologen-Vorprüfung
1.3.1975 bis 31.3.1977	Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes
Dezember 1975	mündliche Diplom-Biologen-Haupt- prüfung; Hauptfach: Biochemie, Nebenfächer: Botanik und orga- nische Chemie
1.1.1976 bis 2.3.1977	Diplomarbeit bei Prof. Dr. L. Jae- nicke im Institut für Biochemie der Universität zu Köln
seit 1.6.1977	Arbeit an vorliegender Disserta- tion bei Prof. Dr. H. Sahm, Insti- tut für Biotechnologie I der Kern- forschungsanlage Jülich GmbH